

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Mejora y evaluación de metodología para el diagnóstico de laboratorio
de la rubeola: epidemiología molecular del virus de la rubeola en
España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alex Omar Martínez Torres

Directores

Juan Emilio Echevarría Mayo
Fernando de Ory Manchón
María del Mar Mosquera Gutiérrez

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN INMUNOLOGÍA

**MEJORA Y EVALUACIÓN DE
METODOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO
DE LABORATORIO DE LA RUBÉOLA.
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS
DE LA RUBÉOLA EN ESPAÑA**

CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
MAJADAHONDA (MADRID)

DOCTORANDO: ALEX OMAR MARTÍNEZ TORRES

DIRECTORES DE TESIS: JUAN EMILIO ECHEVARRÍA MAYO

FERNANDO DE ORY MANCHÓN

MARÍA DEL MAR MOSQUERA GUTIÉRREZ

TUTOR DE TESIS: JOSÉ PRIETO PRIETO

Madrid, a 20 de noviembre 2013

JUAN EMILIO ECHEVARRÍA MAYO, FERNANDO DE ORY MANCHÓN, Científicos Titulares del Instituto de Salud Carlos III, y MARÍA DEL MAR MOSQUERA GUTIÉRREZ, Especialista en Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona.

CERTIFICAN QUE: ALEX OMAR MARTÍNEZ TORRES

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral, con el título: MEJORA Y EVALUACIÓN DE METODOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA RUBÉOLA. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA EN ESPAÑA.

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 20 de noviembre de 2013

JUAN EMILIO ECHEVARRÍA



FERNANDO DE ORY



MARÍA DEL MAR MOSQUERA





AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primero a Dios por haberme permitido adquirir una beca para realizar estudios de Doctorado. A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación-SENACYT y al Instituto para la Formación y Aprovechamiento de los Recursos Humanos-IFARHU de Panamá, por haberme brindado la oportunidad de obtener la Beca para mis Estudios de Doctorado. A Juan, por haber creído en mí y haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en el Laboratorio que dirige, proporcionando los recursos y brindándome los conocimientos necesarios para poder desarrollar este trabajo. A Mar, más que una co-directora, una amiga, por toda la paciencia que tuvo conmigo, por todo el apoyo y conocimiento recibido de su parte. A Fernando, por su contribución como co-director y por todo su apoyo. A mis compañeros(as) y amigos(as) de laboratorio y de almuerzos, Sonia, Quique, Carolina, Ana Bárcena, Marta, Ana Avellón, Paco, Inma, Ana Falcón, Ana Revilla y Juan Ledesma por sus valiosos consejos e incentivos para poder terminar este trabajo. A Miguel Thomson, por sus consejos y conocimientos transmitidos. A Juan Carlos que me brindó su apoyo. A Ana, Irene, Paloma, Carmen, Paco, José Miguel, Nieves, Lala, Lourdes, Isabel y Jesús por su gran ayuda y consejos. Al Profesor Humberto Cornejo por su valioso apoyo y consejos. A mis compañeros y amigos, Nidia Sandoval y Alberto Mena por su apoyo en el Departamento. A mi gran amigo Gabriel Vega por su gran apoyo y estar siempre ahí cuando lo necesité. A todos nuestros amigos(as) que dejamos en Majadahonda (Denis, Casto, Paula, Leopoldo, Isma, Daniel), por haber hecho nuestra estancia mucho más llevadera. A la Universidad de Panamá, por haberme brindado una licencia con sueldo. A todas las personas, que de una u otra forma me apoyaron para poder realizar este trabajo, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis Padres (QEPD), Lidia Mercedes Torres de Martínez y Luis M. Martínez Gutierrez por haberme dado la vida y por todas las enseñanzas que me brindaron en mi crianza. A mis hijas Sara Alexandra y Tatiana por estar siempre a mi lado y por todo su apoyo. A mi esposa, Sara Ahumada-Ruiz, que sin su ayuda y comprensión de una manera incondicional, no lo hubiese logrado. A todos(as) mis hermanos(as) por su valioso apoyo y en especial a mi hermana Mireya, por todos los sacrificios realizados por la familia. A la señora Zoraida, que es como mi segunda madre, por siempre estar pendiente de nosotros. A mis sobrinos, que siempre estuvieron ahí con una voz de aliento. A Michella y Agustín, por estar siempre a nuestro lado en los momentos más difíciles. A mi gran amigo Eduardo Guerrero, que siempre estuvo pendiente de nosotros. A Angie y Alberto, por habernos brindado su cariño y comprensión en nuestra estancia en España. A todos mis amigos(as), que siempre estuvieron pendientes de mí y de mi familia.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
 INTRODUCCIÓN	 8
 <i>1. VIRUS DE LA RUBÉOLA</i>	 9
1.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN.....	9
1.2 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS.....	13
1.3 PATOGENIA	15
1.3.1. RUBÉOLA ADQUIRIDA POSTNATALMENTE.	15
1.3.2 RUBÉOLA CONGÉNITA.	16
1.4 RESPUESTA INMUNE.....	18
1.4.1 INMUNIDAD HUMORAL.	18
1.4.2 INMUNIDAD CELULAR.	19
1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	19
1.5.1 INFECCIÓN AGUDA.	19
1.5.2 SÍNDROME DE RUBÉOLA CONGÉNITA.....	20
1.5.3 ENFERMEDAD NEUROLÓGICA RETARDADA.....	22
1.6 DIAGNÓSTICO	23
1.6.1 <i>DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL</i>	23
1.6.2 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	23
1.7 EPIDEMIOLOGÍA.....	25
1.7.1 INCIDENCIA.....	25
1.7.2 EDAD	26
1.7.3 ORIGEN Y DISEMINACIÓN DE LAS EPIDEMIAS	26
1.7.4 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	27
1.7.4.1 CRITERIOS PARA RECONOCER UN GENOTIPO.....	29
1.7.4.2 NOMENCLATURA DE CEPAS.....	30
1.8 PROFILAXIS. VACUNA TRIPLE VÍRICA	35
1.8.1 DESARROLLO DE VACUNAS.....	36

1.8.2 PAUTAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	37
1.8.3 CONTRAINDICACIONES	37
1.8.4 EFECTOS SECUNDARIOS	38
1.8.5 FUTURO DE LA VACUNA TRIPLE VÍRICA	39
<i>2. CONTROL DE LA RUBÉOLA.....</i>	<i>40</i>
<i>3. OTROS VIRUS PRODUCTORES DE EXANTEMA</i>	<i>50</i>
3.1 VIRUS DEL SARAMPIÓN.	50
3.1.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	51
3.1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL.	53
3.1.3 DIAGNÓSTICO.	56
3.2 PARVOVIRUS B19.....	58
3.2.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	59
3.2.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	61
3.2.3 DIAGNÓSTICO.	61
3.3 OTROS VIRUS EXANTEMÁTICOS.....	62
3.3.1 ADENOVIRUS.....	62
3.3.2 ENTEROVIRUS.....	64
3.3.3 HERPESVIRUS.....	66
3.3.4 VIRUS DEL DENGUE.	70
OBJETIVOS	72
MATERIAL Y MÉTODOS.....	74
<i>1. MUESTRAS Y CEPAS.....</i>	<i>75</i>
1.1 CEPAS DE VIRUS.....	75
1.2 MUESTRAS DE UN BROTE DE RUBÉOLA DECLARADO EN LA COMUNIDAD DE MADRID EN 2004/2005.	75
1.3 MUESTRAS DE UN BROTE DE RUBV DECLARADO EN ALGECIRAS EN 2008.	75
1.4 MUESTRAS RETROSPECTIVAS DE HISOPADO FARÍNGEO U ORINA DE PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA INICIAL DE SARAMPIÓN QUE PRESENTARON AL HACER DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL IGM POSITIVA O EQUÍVOCA PARA VIRUS DE LA RUBÉOLA.....	76
1.5 SUEROS DE ARCHIVO DE LA COLECCIÓN DEL ISCHII CON MARCADORES DE INFECCIÓN RECIENTE O PASADA POR VIRUS DE LA RUBÉOLA.	77

1.6 MUESTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO DE MUJERES EMBARAZADAS CON SOSPECHA DE INFECCIÓN POR VIRUS DE LA RUBÉOLA NEGATIVAS POR RT-PCR MÚLTIPLE FRENTE A VIRUS EXANTEMÁTICOS.	77
<i>2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.</i>	<i>77</i>
2.1 RUBÉOLA.	77
<i>3. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR.</i>	<i>78</i>
<i>4. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA.</i>	<i>79</i>
4.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	79
4.2 ENSAYO DE EXTRACCIÓN CON PARTÍCULAS MAGNÉTICAS CUBIERTAS CON ESTREPTAVIDINA.	80
4.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y AMPLIFICACIÓN SIMULTÁNEA PARA VIRUS EXANTEMÁTICOS (VIRUS DEL SARAMPIÓN, VIRUS DE LA RUBÉOLA Y PARVOVIRUS B19).	80
4.4 MEJORA DE LA SENSIBILIDAD MEDIANTE EL USO DE COADYUVANTES.	80
4.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA GENOTIPIFICACIÓN.	80
4.6 AJUSTE DE PARÁMETROS DE PRIMERA REACCIÓN DE PCR Y SEGUNDA REACCIÓN DE PCR O “NESTED” PARA GENOTIPADO.	81
4.7 SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	81
4.8 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	81
<i>5. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.</i>	<i>82</i>
5.1 TITULACIÓN DE LA VACUNA DEL VRUB POR LA TÉCNICA DE PLAQUEO DE DULBECCO.	82
5.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTO PURIFICADO DE VIRUS.	83
5.3 TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TRANSFERENCIA A MEMBRANAS SINTÉTICAS (<i>WESTERN BLOTTING</i> : WB)	84

RESULTADOS 85

<i>1. ENSAYO DE EXTRACCIÓN CON PARTÍCULAS MAGNÉTICAS CUBIERTAS CON ESTREPTAVIDINA.</i>	<i>86</i>
<i>2. MEJORA DE LA SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE PARA VIRUS EXANTEMÁTICOS.</i>	<i>90</i>
<i>3. ESTIMACIÓN DE LA MEJORA DE LA SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE PARA VIRUS EXANTEMÁTICOS MODIFICADA CON MUESTRAS DEL BROTE DE RUBÉOLA DE MADRID 2004/2005.</i>	<i>92</i>
<i>4. DESARROLLO DE UNA RT-PCR ANIDADA PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.</i>	<i>94</i>

4.1 DISEÑO DE LOS INICIADORES.....	94
4.2 AJUSTE DE PARÁMETROS DE PRIMERA REACCIÓN DE PCR.....	96
4.3 AJUSTE DE PARÁMETROS DE SEGUNDA REACCIÓN DE PCR O “NESTED”.	99
4.4 ENSAYO DE COADYUVANTES PARA MEJORA DE LA SENSIBILIDAD.	102
4.5 EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD Y DE SENSIBILIDAD COMPARATIVA CON AISLAMIENTO EN CULTIVOS.....	103
4.6 RESULTADOS OBTENIDOS CON LA RT-PCR DE GENOTIPADO CON LAS MUESTRAS CLÍNICAS RESTROSPECTIVAS Y PROSPECTIVAS DEL CNM.	104
5. GENOTIPOS DE RUBV ENCONTRADOS EN ESPAÑA, 1998-2009	105
5.1 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1j.....	109
5.2 ANÁLISIS DE SECUENCIA DEL GENOTIPO 2B.....	117
5.3. ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1a	124
5.4 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1E.....	129
5.5 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1i.....	134
6. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	138
6.1 TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TRANSFERENCIA A MEMBRANAS SINTÉTICAS (<i>WESTERN BLOTTING</i> : WB); DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA.	138
6.2 RESULTADOS DEL WESTERN BLOTTING	139
DISCUSIÓN	142
CONCLUSIONES	156
BIBLIOGRAFÍA	159
ARTÍCULO	183

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE LA PARTÍCULA VIRAL DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.....	10
FIGURA 2. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA	13
FIGURA 3. ESQUEMA DEL CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA	15
FIGURA 4. PATOGÉNESIS DE LA RUBÉOLA CONGÉNITA	15
FIGURA 5. DIAGRAMA REPRESENTANDO EL CURSO DE LA INFECCIÓN AGUDA DE LA RUBÉOLA.....	15
FIGURA 6. EXANTEMA MACULOPAPULAR.	20
FIGURA 7. NIÑO CON SÍNDROME DE RUBÉOLA CONGÉNITA.....	22
FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL RUBV DESDE 1995 A 2006....	34
FIGURA 9. CONVULSIONES FEBRILES POSTVACUNACIÓN DE PACIENTES EXTERNOS ENTRE 12 Y 23 MESES DE EDAD DE ACUERDO A LA VACUNA RECIBIDA.	40
FIGURA 10. COBERTURA DE LA VACUNA DE RUBÉOLA EN LA REGIÓN EUROPEA DE LA OMS, 2009	46
FIGURA 11. INCIDENCIA DE SARAMPIÓN Y RUBÉOLA Y COBERTURA DE VACUNACIÓN CON TV. ESPAÑA 1982-2010.....	49
FIGURA 12. ESQUEMA DE LA PLACA DE 12 POCILLOS USADA PARA HACER EL ENSAYO DE TITULACIÓN VIRAL.	83
FIGURA 13. CURVA DE CALIBRACIÓN CON DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN CON ESFERAS MAGNÉTICAS.	87
FIGURA 14. ESTANDARIZACIÓN DE TIEMPO DE UNIÓN A LAS ESFERAS MAGNÉTICAS	88
FIGURA 15. ESTANDARIZACIÓN DE CONCENTRACIÓN DEL COMPLEJO EXTRACTO DE ARN-SONDA ESPECÍFICA Y DE ESFERAS MAGNÉTICAS..	88
FIGURA 16. ESTANDARIZACIÓN DE TIEMPO DE UNIÓN DE LA Sonda ESPECÍFICA CON EL ARN EXTRAÍDO.....	89
FIGURA 17. CURVA DE CALIBRACIÓN CON ESFERAS MAGNÉTICAS ELUIDAS Y SIN ELUIR	89
FIGURA 18. COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON ESFERAS MAGNÉTICAS CON CONDICIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A OTROS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	90
FIGURA 19. RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE PARA VIRUS EXANTEMÁTICOS MODIFICADA CON BETAÍNA 5 M Y SIN MODIFICAR.....	91
FIGURA 20. ESQUEMA DE RESULTADOS OBTENIDOS EN EL BROTE DE LA CAM CON LA RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE SIN BETAÍNA	93

FIGURA 21. ESQUEMA DE RESULTADOS OBTENIDOS EN EL BROTE DE LA CAM CON LA RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE MODIFICADA CON BETAÍNA	93
FIGURA 22. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICACIÓN DE RUBÉOLA	95
FIGURA 23. EXPERIMENTO DE ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SO_4Mg PARA EL VIRUS DE LA RUBÉOLA	96
FIGURA 24. EXPERIMENTO DE ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SO_4Mg PARA EL VIRUS DE LA RUBÉOLA	97
FIGURA 25. ESTANDARIZACIÓN COMBINADA DE LA CONCENTRACIÓN DE INICIADORES Y dNTPs PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA	97
FIGURA 26. ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN DE GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.....	98
FIGURA 27. ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN DE GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA ...	98
FIGURA 28. CURVA DE DILUCIONES DE LA VACUNA DE RUBV PARA SELECCIONAR LAS DILUCIONES DE TRABAJO PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA 2ª REACCIÓN PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA	99
FIGURA 29. EXPERIMENTO DE ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Cl_2Mg PARA LA 2ª REACCIÓN DEL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.....	100
FIGURA 30. ESTANDARIZACIÓN COMBINADA DE LA CONCENTRACIÓN DE INICIADORES Y DNTPS PARA LA 2ª REACCIÓN DEL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.....	100
FIGURA 31. ESTANDARIZACIÓN COMBINADA DE LA CONCENTRACIÓN DE INICIADORES Y dNTPs PARA LA 2ª REACCIÓN DEL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.....	101
FIGURA 32. ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN DE LA 2ª REACCIÓN PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA	101
FIGURA 33. ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN DE LA 2ª REACCIÓN PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.....	101
FIGURA 34. PRUEBA DE ESTANDARIZACIÓN CON BETAÍNA, DMSO-BME Y DMSO-GLICEROL.	103
FIGURA 35. PRUEBA DE SENSIBILIDAD CON BETAÍNA Y DMSO-BME. .	103
FIGURA 36. INMUNOFLUORESCENCIA DE UNA DE LAS CEPAS AISLADAS DEL BROTE DE MADRID, 2004/2005.....	104
FIGURA 37. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON EL MÉTODO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA	

OMS EN EL GEN E1 PARA LOS GENOTIPOS ENCONTRADOS EN ESPAÑA, 1998-2009.	108
FIGURA 38. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON EL MÉTODO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1j.	110
FIGURA 39. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON LA INFERENCIA BAYESIANA DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1j.	111
FIGURA 40. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON EL MÉTODO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 2B.	118
FIGURA 41. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON LA INFERENCIA BAYESIANA DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 2B.	119
FIGURA 42. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON EL MÉTODO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1a.	125
FIGURA 43. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON LA INFERENCIA BAYESIANA DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1a.	126
FIGURA 44. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON EL MÉTODO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1E.	130
FIGURA 45. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON LA INFERENCIA BAYESIANA DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1E.	131
FIGURA 46. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON EL MÉTODO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1i.	135
FIGURA 47. ÁRBOL FILOGENÉTICO CON LA INFERENCIA BAYESIANA DE LA VENTANA MÍNIMA ACEPTABLE RECOMENDADA POR LA OMS EN EL GEN E1 PARA EL GENOTIPO 1i.	136
FIGURA 48. <i>WESTERN-BLOTTING</i> DE SUEROS HUMANOS DE POSIBLES CASOS ESPORÁDICOS Y CASOS INVOLUCRADOS EN BROTES DE RUBÉOLA FRENTE A PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA REVELADO CON ANTI-IGG HUMANA.	141

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. RASGOS CLÍNICOS PROMINENTES DEL SÍNDROME DE RUBÉOLA CONGÉNITO.....	22
TABLA 2. CEPAS DE REFERENCIA DE GENOTIPOS DE RUBV ACTUALIZADO POR LA OMS EN EL 2007.	28
TABLA 3. DISTRIBUCIÓN GLOBAL DE LOS GENOTIPOS CIRCULANTES DEL RUBV DESDE EL 2005 AL 2010.	32
TABLA 4. COBERTURA NACIONAL CON PRIMERA Y SEGUNDA DOSIS DE VACUNA TRIPLE VÍRICA (SARAMPIÓN-RUBÉOLA-PAROTIDITIS) DESDE 2003 HASTA 2010.....	35
TABLA 5. ELIMINACIÓN DE LA RUBÉOLA EN LAS AMÉRICAS: ÚLTIMOS PAÍSES EN REALIZAR CAMPAÑAS DE VACUNACIÓN.....	41
TABLA 6. NÚMERO DE CASOS DE RUBÉOLA INFORMADOS Y PORCENTAJE CONFIRMADO POR LABORATORIO DESDE 2000 A 2007 EN EUROPA.....	44
TABLA 7. INCIDENCIA DE RUBÉOLA DECLARADA. ESPAÑA 1982-2010.	48
TABLA 8. CASOS DE SARAMPIÓN EN ESPAÑA, 2010-2012.....	56
TABLA 9. RENDIMIENTO DE LOS DIFERENTES MARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA CON LA RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE CON BETAINA Y SIN BETAINA	94
TABLA 10. RESULTADOS DE LAS AMPLIFICACIONES CON LA RT-PCR DE GENOTIPADO DE MUESTRAS CLÍNICAS RESTROSPECTIVAS Y PROSPECTIVAS DEL CNM.	105
TABLA 11. GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA ENCONTRADOS EN ESPAÑA EN EL PERIODO DE 1998-2009.	107
TABLA 12. PORCENTAJE DE HOMOLOGÍA DE LA VENTANA DE 739 NT DEL GEN E1 RECOMENDADA POR LA OMS DE TODAS LAS SECUENCIAS DE GENOTIPO 1j.	112
TABLA 13. DIFERENCIAS EN LOS NUCLEÓTIDOS Y LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LOS CUATROS GRUPOS Y SECUENCIAS INDIVIDUALES COMPARADAS CON LA SECUENCIA DE REFERENCIA RVS/MIAMI.FL.USA/32.02[1j] Y LA SECUENCIA ESPAÑOLA MAYORITARIA 277E.....	116
TABLA 14. PORCENTAJE DE HOMOLOGÍA DE LA VENTANA DE 739 NTS DEL GEN E1 RECOMENDADA POR LA OMS DE TODAS LAS MUESTRAS CLÍNICAS ANALIZADAS DEL GENOTIPO 2B Y SECUENCIAS DE REFERENCIA	120
TABLA 15. DIFERENCIAS EN LOS NUCLEÓTIDOS Y LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS EN EL ÚNICO GRUPO Y SECUENCIAS INDIVIDUALES COMPARADAS CON LA SECUENCIA DE REFERENCIA	

RVI/SEATTLE.USA/16.00[2B] Y LA SECUENCIA ESPAÑOLA MAYORITARIA 776F08.	123
TABLA 16. HOMOLOGÍA DE LA VENTANA DE 739 NT DEL GEN E1 RECOMENDADA POR LA OMS DE TODAS LAS MUESTRAS CLÍNICAS ANALIZADAS DEL GENOTIPO 1a Y SECUENCIAS DE REFERENCIA.	127
TABLA 17. HOMOLOGÍA DE LA VENTANA DE 739 NT DEL GEN E1 RECOMENDADA POR LA OMS DE TODAS LAS MUESTRAS CLÍNICAS ANALIZADAS DEL GENOTIPO 1E Y SECUENCIAS DE REFERENCIA.....	132
TABLA 18. HOMOLOGÍA DE LA VENTANA DE 739 NTS DEL GEN E1 RECOMENDADA POR LA OMS DE TODAS LAS MUESTRAS CLÍNICAS ANALIZADAS DEL GENOTIPO 1i Y SECUENCIAS DE REFERENCIA	137
TABLA 19. DIFERENCIAS EN LOS NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DE LAS SECUENCIAS DE EXUDADO FARÍNGEO Y AISLAMIENTO COMPARADAS CON LA SECUENCIA 921I08.	138
TABLA 20. CARACTERÍSTICAS DE LA RESPUESTA INMUNE POR MEDIO DE <i>WESTERN-BLOTTING</i> DE SUEROS HUMANOS DE POSIBLES CASOS ESPORÁDICOS Y CASOS INVOLUCRADOS EN BROTES DE RUBÉOLA FRENTE A PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA REVELADO CON ANTI-IgM HUMANA	140
TABLA 21. CARACTERÍSTICAS DE LA RESPUESTA INMUNE POR MEDIO DE <i>WESTERN-BLOTTING</i> DE SUEROS HUMANOS DE POSIBLES CASOS ESPORÁDICOS Y CASOS INVOLUCRADOS EN BROTES DE RUBÉOLA FRENTE A PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA REVELADO CON ANTI-IgG HUMANA.....	140
TABLA 22. VARIACIONES ENCONTRADAS EN BROTES DE MÁS DE CIENTO CASOS Y DE MENOS DE VEINTE CASOS EN RELACIÓN A LA POSICIÓN NUCLEOTÍDICA Y AL CICLO DE REPLICACIÓN.....	152

ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA

A: Adenosina.
aa: Aminoácidos.
ACIP: *Advisory Committee on Immunization Practices*.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADNc: ADN complementario.
AdV: Adenovirus.
ARN: Ácido ribonucleico.
B19V: Parvovirus B19.
B95: Línea celular linfóide de mono tití.
BHK21: Línea celular de riñón de hamster bebe 21.
βME: Beta mercapto-etanol.
C: Proteína de la cápside.
CAM: Comunidad Autónoma de Madrid.
CCAA: Comunidades Autónomas.
CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*).
Cl₂Mg: Dicloruro de magnesio.
CMV: Citomegalovirus.
CNM: Centro Nacional de Microbiología.
CO₂: Dióxido de carbono.
DENV: Virus del dengue.
DICT: Dosis infecciosas en cultivo de tejido.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.
dATP: Desoxiadenina trifosfato.
dGTP: Desoxiguanina trifosfato.
dCTP: Desoxicitosina trifosfato.
dTTP: Desoxitimina trifosfato.
E1: Glicoproteína de superficie 1.
E2: Glicoproteína de superficie 2.
EBNA: Antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr.
EBV: Virus de Epstein-Barr.
ECP: Efecto citopático.
EEC: Europa oriental y central.
EEUU: Estados Unidos de América
ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).
EMEM: Medio esencial mínimo Eagle.
EO: Europa occidental.
EV: Enterovirus.
GC: Guanina-citosina.
h: hora.
H₂O: Agua.
HEK: Línea celular primaria de riñón embrionario humano.
HHV-6: Herpesvirus humano 6.
HHV-7: Herpesvirus humano 7.
IC: Intervalo de confianza.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.
IHA: Inhibición de hemaglutinación.
IgA: Inmunoglobulina A.
IgM: Inmunoglobulina M.
IgG: Inmunoglobulina G.
IR: Incidencia anual.
IRC: Infección de rubéola congénita.
ISCIH: Instituto de Salud Carlos III.
ITCF: Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*).
Kb: Kilobases.
KDa: KiloDaltons.
L: Polimerasa de ARN.
LCR: Líquido cefalorraquídeo.
M: Proteína de la matriz.
mA: Miliamperios.
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
min: Minutos.
MeV: Virus del sarampión.
ml: Mililitros.
N: Nucleoproteína.
NEI: Nuevos estados independientes de la Unión Soviética.
nm: Nanómetro.
nt: Nucleótidos.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OPS: Organización Panamericana de la Salud.
ORF: Marcos de lectura abierta.
P: Fosfoproteína.
p90: Proteína no estructural 90.
p150: Proteína no estructural 150.
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide gel electrophoresis*).
pb: Pares de bases.
PBS: Tampón salino fosfatado (PBS: *phosphate buffered solution*).
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*).
PE: Proteínas Estructurales.
PEES: Panencefalitis esclerosante subaguda.
pp65: Fosfoproteína de la matriz del CMV.
PPR: Panencefalitis progresiva por rubéola.
PRV: Virus de la pseudorrabia.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
RER: Retículo endoplasmático rugoso.
RNT: Región no traducible.
rpm: Revoluciones por minutos.
RT: Transcripción inversa.
RT-PCR: Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa (*Retrotranscription-Polymerase Chain reaction*).
RUBV: Virus de la rubéola.
S: Unidad Svedberg o coeficiente de sedimentación.
SBF: Suero Bovino Fetal.

SE: Semana epidemiológica.
seg: Segundos.
SDS: Dodecíl sulfato de sodio.
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
SNC: Sistema nervioso central.
SO₄Mg: Sulfato de magnesio.
SR: Virus de sarampión y rubéola.
SRC: Síndrome de rubéola congénita.
SRP: Virus de sarampión, rubéola y parotiditis.
SRPV: Virus de sarampión, rubéola, parotiditis y varicela.
T: Linfocitos T.
TA: Temperatura ambiente.
TV: Vacuna tripe vírica: SRP.
VCA: Antígeno de la cápside vírica.
VIH: Virus de inmunodeficiencia adquirida
Vero: Línea celular de riñón de mono verde africano.
Vero E6: Línea celular de riñón de mono verde africano clon E6.
Vero-hSLAM: Línea celular de riñón de mono verde africano con receptor CD150 o SLAM.
VSD: “*Vaccine Safety Datalink*”.
WB: *Western-blotting*.
5 M: Cinco molar.
°C: Grado centigrado.
µg: Microgramos.
µl: Microlitros.
%: Tanto por ciento.

RESUMEN

SUMMARY

1. INTRODUCTION

The rubella virus (RUBV) usually causes a mild rash illness that is frequently accompanied by joint pain and, occasionally, lymphadenopathy. Complications of this infection are rare and include encephalopathy and thrombocytopenia. However, the most serious consequence of this virus is its teratogenicity. This virus can cause Congenital Rubella Syndrome (CRS) when infection occurs in pregnant women, particularly in the first trimester of pregnancy. In Spain, monovalent RUBV vaccine was introduced in the late 1970s, when it was administered in schools to 11-year-old girls. In 1981, one dose of the measles-mumps-rubella combined vaccine was introduced in the regular immunization schedule at the age of 15 months for all children. In 1996, a second dose at 11 years of age was introduced. In 1999, this second dose was changed to 4-year-old children. Currently, the European Region of the World Health Organization (WHO) aims to eliminate not only measles but also rubella and to reduce the incidence of CRS to less than one case per 100,000 live births by 2015. For this purpose, epidemiological surveillance based on the laboratory diagnosis of each suspected case and the characterization of the genotype of the circulating strains are included in WHO's recommendations. In 2008, the National Plan for Elimination of Rubella was implemented in Spain using the logistics of the National Plan for Elimination of Measles in force since 2000, as part of the elimination strategy in Europe defined by WHO. The laboratory confirmation of all suspected cases is a fundamental tool defined in the plan, as well as the determination of the genotype involved in all outbreaks and sporadic cases. Detection of RUBV RNA directly in clinical specimens could be an important complement to the detection of IgM in the diagnosis of recent infections, especially congenital, taking into account the scarce research developed in this issue. With this objective in mind, a multiplex nested RT-PCR for exanthematic viruses was designed (Measles, RUBV and parvovirus B19) in the Centro Nacional de Microbiología (CNM). However, a lower sensitivity than expected in comparison with specific IgM to RUBV was observed when a rubella outbreak arose in Madrid in 2004/2005. The WHO update on standard nomenclature for the classification and designation of wild-type RUBV strains recognizes nine definitive and four provisional genotypes, expanding the nomenclature established in 2005, which was based on 739 nucleotides (nt) (nt 8731 to 9469) from the E1 gene sequence. This sequence encodes amino acids (aa) 159 to 404 (of the 481 aa) of the E1 glycoprotein. Although our knowledge of the geographical distribution of RUBV genotypes has grown substantially since 2003, the genotypes present in many countries and regions remain unknown. There was no previous information on RUBV genotypes in Spain before this thesis.

This study highlights the necessity of both new laboratory tools and knowledge about molecular epidemiology of rubella that arise with the

National Plan of Elimination of Rubella in Spain and its strategy of an accurate surveillance of each individual case.

2. HYPOTHESIS

The hypothesis considered in this study are the following:

- a) The low sensitivity revealed by the multiplex RT-PCR used at CNM with respect to RUBV diagnosis, could be improved by the addition of 5 M betaine as adjuvant, in order to reach an efficiency at least similar to that of MeV.
- b) The circulation pattern of RUBV genotypes should be consistent with the low incidence and with the interruption of endemic circulation.
- c) The importation origin of sporadic cases and outbreaks of rubella should be traceable through the study of virus genotypes and the available information on global distribution of RUBV genotypes.
- d) The characterization of immune response to RUBV individual proteins through *Western-Blot* should allow the differentiation of specific from nonspecific IgM reactions, as well as recent acute infection versus past infection from IgG reactivities. So it could be a useful marker in the diagnosis of RUBV acute infection, especially in pregnant women.

3. OBJECTIVES

- **Improvement of sensitivity in rubella virus detection using a multiplex PCR for simultaneous detection of measles virus, rubella virus and parvovirus B19** from the CNM portfolio, whose performance for the diagnosis of RUBV infections had proved to be insufficient.
- **Development of technology for rubella virus genotyping** based on WHO recommendations for harmonization of RUBV genotype characterization.
- **Study of rubella virus genotypes circulation in Spain between 1998 and 2009, and its variability in the context of outbreaks**, with the purpose of establishing epidemiological circulation patterns and evaluating the preliminary situation prior to face the implementation of the National Plan of Elimination in Spain.
- **Development and evaluation of a technique for the characterization of a specific or nonspecific immune response against rubella virus**, in order to discriminate false from true positives in the serological diagnosis of acute infection by this virus, especially in pregnant patients, due to its repercussion as a legal cause of therapeutic abortion as contemplated by law in case of teratogenicity to the fetus.

4. METHODS

Clinical samples (serum, pharyngeal exudate, and urine samples) collected from 75 infected people during a RUBV outbreak that occurred in the Madrid Community in 2004 and 2005, 18 clinical samples collected from 18 patients during a RUBV outbreak detected in Algeciras (Cádiz) in 2008, 150 cases with original clinical suspicion of measles that yielded positive or equivocal IgM to RUBV in serum during the screening were analyzed. In addition, 369 sera with markers of recent or past infection by RUBV from the CNM collection and 65 samples of amniotic fluid from pregnant women with suspected RUBV infection previously negative by the multiplex nested RT-PCR against exanthematic viruses were tested. Specimens were collected and processed in accordance to WHO recommendations.

Isolation was performed in Vero and fetal lung fibroblast cell lines. A previously developed and evaluated multiplex nested RT-PCR (MeV, RUBV and B19V), whose design and characteristics were unique, was used. It had the inconvenient of a suboptimal sensitivity to detect RUBV.

Four oligonucleotides were designed to genotype RUBV. They covered the 739 nt window of the E1 gene recommended by WHO (nt 8731-9469). The reaction parameters in a multiplex nested RT-PCR format were empirically adjusted. PCR products were sequenced in both directions on an automated sequencer. Sequences were assembled and aligned with WHO reference sequences. Phylogenetic analysis was done with the MEGA v. 4.0 program, adopting the neighbor-joining Kimura 2-parameter distance method with 1,000 replicates and by Bayesian inference with MrBayes v. 3.1, using an evolutionary model (GTR + CAT + I).

Purified extracts from a titred RA27/3 vaccine strain were prepared for its use in the *Western-Blot* analysis. Extracts were first subjected to polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to nitrocellulose membranes. Sera from patients were tested using these membranes revealing with anti-IgG and anti-IgM conjugate.

5. RESULTS AND DISCUSSION

After several standardization experiments with different adjuvants used in the genotyping PCR of RUBV, 5 M betaine showed the best results. Thus, it was chosen to improve the performance of the exanthematic viruses multiplex nested RT-PCR. Serial dilutions from 10^{-1} to 10^{-9} of RNAs extracted from RUBV vaccine, one MeV positive clinical sample and one B19V positive clinical sample were prepared. These extracts were tested in parallel in the multiplex nested RT-PCR for exanthematic viruses with and without betaine. An increase of sensitivity of 4 logs for RUBV was found with the introduction of 5 M betaine. Also, an increment in intensity of the amplified bands for MeV and, especially, for B19V was observed. Pharyngeal exudate, serum and urine specimens from a RUBV outbreak occurring in Madrid in 2004/2005, previously analyzed with the PCR without betaine, were tested with the modified PCR (with betaine) to validate the impact of the observed increment

of sensitivity in diagnostic performance. An increase of 42,4% in positive cases detected in pharyngeal exudate, 24,2% in sera and 37,4% in urine was observed with the modified technique compared to the results of the original evaluation made by Mosquera *et al.* EIMC 2006; 24: 251-253 with samples from the same outbreak. These results validate the modification made to the technique adding betaine. Eighty one positive amplifications with the genotyping RT-PCR were obtained on 150 clinical samples (serum, pharyngeal exudate, urine, cerebrospinal fluid, amniotic fluid, blood and saliva) from the same number of cases collected from 1998 to 2009. Seventy five out of 81 positives, which include cases from RUBV outbreaks of Madrid 2004/2005 and Algeciras 2008, were analyzed along with WHO reference sequences, to determine the genotype. On the other side, there was no amplification in 369 serum samples from CNM collection and 65 samples of amniotic fluid. Phylogenetic analysis of the sequences showed circulation of 5 out of 13 RUBV genotypes in Spain (1a, 1E, 1j, 1i and 2B), without predominance of any. This suggests that during these years there were no indigenous circulation, but a series of imported outbreaks, confirming the findings of epidemiological data analysis. The importation sources are generally consistent with our geographic and cultural ties, highlighting mainly Europe (genotypes 1E, 2B, 1i) and Latin America (1j). In this study period, the detection of genotype 1E in 1998 (Canary Islands) and 2003 (Madrid outbreak) was observed, being the only genotype detected in Spain in this period, besides, it could not be detected again until 2009 (sporadic case in Málaga). On the other hand, intermittent detection of sporadic 2B cases in 2004 in El Ejido (Almería) and 2006 in Madrid was shown. After those sporadic cases, this genotype was seen in an outbreak in Algeciras (Cádiz, Andalusia) in 2008, with sporadic cases in the Community of Madrid, the Autonomous City of Ceuta and Valencia. However, the provisional 1j genotype caused a large outbreak in Madrid of 460 cases between 2004 and 2005, affecting mainly the Latin American community with a sporadic case in Seville. This same year very similar strains circulated in Brazil, which suggests that the outbreak could have been imported from Latin America. Afterwards, in 2007 a sporadic case in Barcelona with the same genotype was identified. On the other hand, a neurological clinical case produced by provisional 1i genotype was found in 2008 in Guadalajara. The detection of 1i genotype was of great importance because this genotype was not circulating in Europe since 1994 and its detection in 2008 was probably due to the persistence in the patient due to her immune-compromised status. The unusually variability observed in different strains detected in samples of the same patient separated in time just a few weeks seem to support this hypothesis. Consequently, this is the first evidence of persistence of 1i genotype in immune-compromised patients with possible clinical implications associated with neurological symptoms. Finally, we detected three cases of RA27/3 vaccine strain (genotype 1a) in patients without known history of recent vaccination, suggesting secondary transmission from a vaccinated person. Two cases were immune-compromised individuals suggesting that this circumstance could have been the cause of the associated clinical symptoms, although they were patients with complex pathologies that could be blamed on alternative causes. This study would

provide the first evidence of secondary transmission of RUBV vaccine to immune-compromised patients with possible clinical implications.

Significant associations between serological patterns compatible or not with acute RUBV and *Western-Blot* patterns against structural proteins were not observed. For this reason, this methodological approach did not complement the determination of IgG avidity in the characterization of the reactivity against RUBV IgM.

6. CONCLUSIONS

- The inclusion of the reducing agent 5 M betaine in the multiplex nested PCR technique for RUBV, MeV and B19V, increased in four log the sensitivity for RUBV detection. It caused an increase in the detection of 42,4% in clinical specimens of pharyngeal exudate, 24,2% in serum and 37,4% in urine. An increase in the intensity of the amplified bands for MeV and especially for B19V was also observed. Consequently, the diagnostic efficiency of the technique has been improved to the point of making genome detection the marker with the higher performance for diagnosis of RUBV infections, although only its combination with specific IgM detection allows maximum performance.
- We have detected five different RUBV genotypes (1E, 1j, 2B, 1i and 1a) in Spain between 1998 and 2009 without continuous circulation of any of them. This pattern is consistent with data on the prevalence of the disease and vaccination coverage, and suggests the interruption of indigenous circulation of the virus.
- The geographical origin of the imported strains of RUBV is in accordance with that expected on the basis of population movements that occurred in Spain during the study period. So, the genotypes most frequently encountered, 1E and 2B, were possibly imported from Europe, although for 2B is more difficult to assure, given its greater ubiquity. Nevertheless, the largest outbreak reported during the study was caused by genotype 1j and their origin was predictably Latin American, coinciding with the population mostly affected.
- The continuous study of genotypes involved in importation episodes seems to reflect the dynamics in the predominant genotypes in the places of origin. Thus, the higher frequency of 1E observed between 1998 and 2003 was also reported in other European countries, and its replacement by 2B in recent years coincided with detection in multiple countries. Finally, the emergence of 1j in Latin American population in Madrid between 2004/2005 coincided with its circulation in Brazil.
- The detection of a neurological infection by 1i genotype seemed to be due to a past infection that was persistently maintained in an immunosuppressed patient, according to the sequence variations

observed in the strains detected in different compartments and the fact that the circulation of this genotype has not been reported since 1994, being considered inactive.

- The infection by RA27/3 vaccine virus detected in three patients without history of vaccination, suggests secondary transmission from an unidentified vaccinated person. Two cases were immune-compromised individuals, which could explain the presence of associated clinical symptoms.
- The patterns of immune response to RUBV individual proteins measured by *Western-Blot* neither correlated with the avidity of IgG nor allowed distinction between specific and nonspecific IgM reactivities. Consequently they do not seem to be useful as a diagnostic marker.

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS DE LA RUBÉOLA

La rubéola es una enfermedad febril aguda, caracterizada por una erupción morbiliforme y linfadenopatía suboccipital y auricular posterior, que afecta principalmente a niños y adultos jóvenes. El virus de la rubéola (RUBV) puede producir enfermedad que va de asintomática a moderada. Sin embargo, la infección durante el embarazo, principalmente en el primer trimestre, puede ocasionar graves anomalías al feto, incluyendo malformaciones congénitas y retraso mental. Estas consecuencias de la infección por el RUBV en el útero son conocidas como Síndrome de Rubéola Congénita (SRC).

1.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

El RUBV es el único miembro del género *Rubivirus* dentro de la familia *Togaviridae*. El otro género de la familia *Togaviridae* es el *Alfavirus*, que contiene 26 miembros que son arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) (40, 105).

Lo que tiene en común el virión de RUBV con los otros miembros de la familia *Togaviridae*, es que posee un ARN monocatenario no segmentado de polaridad positiva y que su estrategia de replicación es similar. Aproximadamente 9.762 nucleótidos (nt) forman su ácido nucleico. Los viriones maduros de RUBV se observan al microscopio electrónico en tinción negativa (ácido fosfotungsténico) como partículas esféricas u ovoides que miden entre 60 a 70 nm (Figura 1b). La cápsida tiene una simetría icosaédrica y contiene 32 capsómeros constituidos por proteína de la cápsida (C) y una copia monocatenaria del genoma de ARN viral. La cápsida está cubierta por una bicapa lipídica de origen celular, que presenta proyecciones de 5 a 8 nm de longitud compuestas por las glicoproteínas víricas transmembrana denominadas E2 y E1. El genoma viral está constituido por dos unidades de transcripción separadas por una región no traducible de 123 nt; la primera unidad está en el extremo 5' de 6.345 nt y codifica para las proteínas no estructurales (PNE), p150 y p90, y la segunda, que está

próxima al extremo 3', con 3.189 nt, codifica para las tres proteínas estructurales (PE): C, E2 y E1. Esta última inicialmente se traduce como una poliproteína precursora de 110 KiloDaltons (KDa), que es procesada post-traduccionamente mediante la acción de una proteasa celular (signalasa), para producir las tres proteínas que forman la estructura del virión, que según su posición en el genoma de 5' a 3' son: la proteína C (33 a 38 KDa), que forma la nucleocápside junto con el ARN viral y dos glicoproteínas de superficie, E2 (42 a 54 KDa) y E1 (58 KDa), que forman las proyecciones del virus (40, 105).

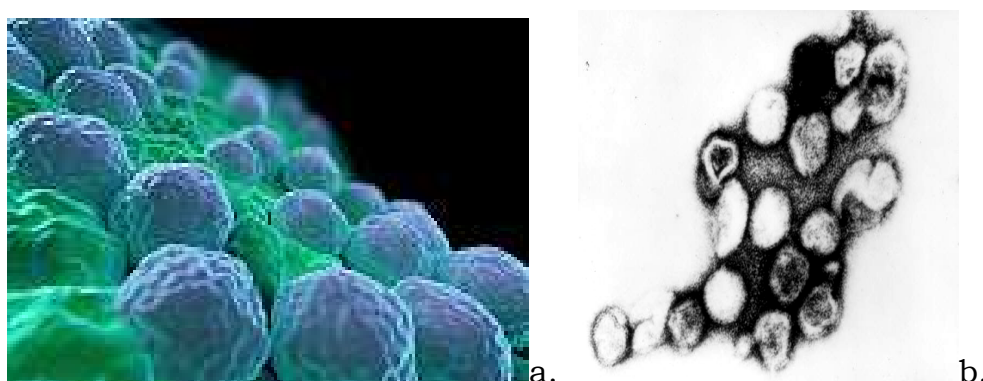


Figura 1. a. Microfotografía electrónica de la partícula viral del RUBV con sus proyecciones víricas comprendidas por las glicoproteínas E1 y E2, la envoltura viral y la nucleocápside con forma icosaédrica (<http://cache2.asset-cache.net/xt/125744555.jpg?v=1&g=fs1%7C0%7CSCF%7C44%7C555&s=1>). **b.** Microfotografía electrónica con tinción negativa (ácido fosfotungsténico) de los viriones del RUBV (http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/08301998/00001/B82-0203_lores.jpg).

La primera unidad de transcripción de 6.345 nt que comprende 2.116 aminoácidos (aa) (Figura 2), también se transcribe inicialmente como una poliproteína precursora de 240 KDa, que posteriormente se escinde proteolíticamente en dos proteínas no estructurales, p150 y p90 (72, 198).

La proteína **p150**, es la más próxima al extremo 5' o N-terminal de la unidad de transcripción, tiene un peso de 150 KDa y comprende 1.300 aa. Esta proteína contiene un motivo metiltransferasa (M) en el extremo N-terminal y otro de proteasa semejante a papaina (P) en el extremo C-terminal. La actividad M se cree que tiene como función ensamblar el capuchón (Cap o 7-metil guanosina) a los ARN mensajeros. La proteasa corta la poliproteína

entre la Gly 1.300 y Gly 1.301. Entre estos dos motivos se encuentra otro llamado X, que también se localiza en la PNE 3 de los alfavirus y en el producto de la unidad de transcripción 5' del virus de la hepatitis E (105). Se desconoce la función de esta proteína, pero se piensa que está implicada en la replicación de los alfavirus.

La proteína **p90**, de 90 KDa, es la segunda PNE, que está codificada en el extremo 3' de la unidad de transcripción y comprende 905 aa. Esta proteína contiene un motivo helicasa (H) y otro ARN polimerasa dependiente de ARN (R) (72).

Después del procesamiento proteolítico celular de la segunda unidad de transcripción, se producen las tres PE (C, E2, E1).

La proteína de la **Cápside (C)**, de 34 KDa, comprende 300 aa (Figura 2). Es una fosfoproteína que existe como un homodímero unido por puentes disulfuro, la cual se une al ARN genómico para formar la nucleocápsida. El mayor dominio de unión de la proteína C al ARN está localizado entre los residuos de aa 28 a 56, pero otras regiones, incluyendo el extremo C-Terminal, podrían estar también implicadas en esta interacción. Además, tiene la capacidad de modular la síntesis de ARN genómico y sub-genómico e inducir apoptosis en ciertas células hospedadoras, sugiriendo que juega un papel importante en la inducción de efecto citopático (ECP) y por ende, en la patogénesis de la infección por RUBV. Otras evidencias sugieren que la proteína C juega un papel importante en la regulación de la replicación del ARN genómico. La proteína C no fosforilada, tiene una alta afinidad por el ARN genómico, indicando que la fosforilación regula negativamente la actividad de unión al ARN de esta proteína (19, 43, 103, 176).

La glicoproteína **E2**, comprende 285 aa (Figura 2) y tiene un rango de peso molecular que varía entre 42 y 54 KDa, dependiendo del grado de glicosilación, que puede estar ligado tanto a O, como a N. El número de sitios de glicosilación ligados a N varían dependiendo de la cepa, aunque los ligados a O contribuyen aún más a la naturaleza heterogénea de la glicoproteína E2. La E2 es uno de los componentes de las espículas del RUBV, siendo una proteína de membrana de clase I, con 39 residuos en la región transmembrana localizados cerca del extremo C-terminal, entre los aa

517 y 555. La E2 está menos expuesta que la E1 en la superficie del virión. La E2 forma un heterodímero con la E1 a través de puentes disulfuro, los cuales se destruyen fácilmente con detergentes como el dodecil sulfato sódico (SDS). Además, esta proteína contiene epítomos neutralizantes implicados en hemaglutinación y también, puede llevar epítomos específicos de cepa (40, 72, 105).

La glicoproteína **E1**, de 58 KDa, comprende 481 aa (Figura 2). Tiene solo glicosilación ligada a N, con azúcares que representan 6 KDa de su peso molecular. Tiene tres sitios potenciales de glicosilación ligados a N (Asn-X-Ser/Thr), todos los cuales son utilizados. La E1 es el componente principal de las espículas del RUBV, siendo una proteína de membrana de clase I, con 22 residuos en la región transmembranal localizados cerca del extremo C-terminal entre los aa 81 y 109, que parecen estar implicados en la interacción con la E2 y en la actividad de fusión con la membrana a pH bajo. La E1 está más expuesta en la superficie del virión que la E2 y contiene sitios de unión a los receptores celulares y de hemaglutinación. También es la proteína más inmunodominante de las proteínas estructurales del RUBV con respecto a la inmunidad humoral y a la unión del virus a la célula. Utilizando anticuerpos monoclonales, se ha demostrado que la E1 contiene un mínimo de seis epítomos no solapados, algunos de los cuales están asociados a hemaglutinación y neutralización (40, 72, 105).

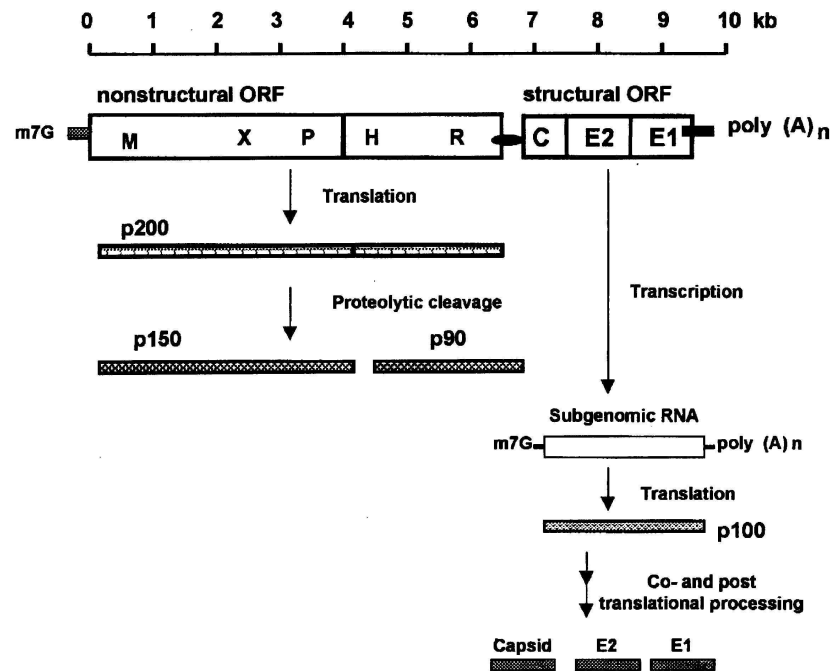


Figura 2. Esquema de la estructura del genoma del RUBV donde se observan los dos marcos de lectura que producen las PNE (p150 y p90) y PE (C, E2 y E1), separados por una RNT de 123 nt (105).

1.2 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS

El RUBV puede infectar una variedad de líneas celulares, lo que indica que el receptor celular utilizado por el virus para la absorción, es probablemente una molécula muy ubicua. Aunque este receptor aún no se ha identificado, parece ser que los fosfolípidos y glicolípidos de la membrana celular, pueden estar implicados en la absorción viral (105).

La ruta de entrada a la célula hospedadora aún no está muy bien definida, pero algunas evidencias sugieren que dicha entrada se produce vía endocitosis mediada por receptores, similar a lo que ocurre con los alfavirus (105).

Existe evidencia que la proteína C experimenta un cambio conformacional a pH bajo (entre pH 5,0 y 5,5), convirtiéndose de hidrofílica a hidrofóbica. Esto puede permitir que la nucleocápsida se adhiera a la membrana endosomal facilitando la salida del ARN genómico viral hacia el citoplasma (105).

La **replicación** y producción de macromoléculas virales se lleva a cabo en el citoplasma celular. La replicación es lenta, con un periodo de latencia o eclipse de 8 a 12 h. Durante la infección del RUBV se pueden detectar cuatro especies de ARN viral distintos. Un ARN genómico monocatenario de 40S ($3,8 \times 10^3$ KDa) y un ARN subgenómico de 24S ($1,2 \times 10^3$ KDa), que corresponde al tercio del extremo 3' del ARN genómico; ambos contienen un capuchón (7-metil guanosina) y una cola de poli-A. Además, existe un ARN intermediario replicativo viral (IR), de doble cadena parcial y un ARN de forma replicativa viral (FR) que representa al ARN de doble cadena completa (72, 105).

Durante la replicación, el ARN genómico de 40S sirve como mensajero para las PNE y como molde para la síntesis de un ARN monocatenario de polaridad negativa de 40S. La cadena negativa actúa a su vez como molde para la transcripción de ambos ARN, de 40S y de 24S. El ARN de 40S recién sintetizado se empaqueta con la proteína C del RUBV, para formar la nucleocápsida. Se ha constatado que la máxima producción de virus ocurre entre las 36 y 48 h después de la infección de líneas celulares permisibles, como las células BHK21 y Vero (40, 105).

El ensamblaje y maduración de las partículas virales ocurre en algunas membranas intracelulares, del aparato de Golgi, del Retículo endoplasmático rugoso (RER), de vacuolas citoplasmáticas y en la membrana plasmática, en las cuales la salida de estas partículas virales se produce por gemación (Figura 3). La maduración del RUBV en sitios citoplasmáticos se debe, presumiblemente, a las señales de retención que se encuentran en el dominio transmembranal de E1 y E2, que favorecen la acumulación y ensamblaje de estas proteínas en el RER y el aparato de Golgi para producir los heterodímeros E2-E1 debidamente plegados y maduros que posteriormente se desprenden por gemación (40, 105).

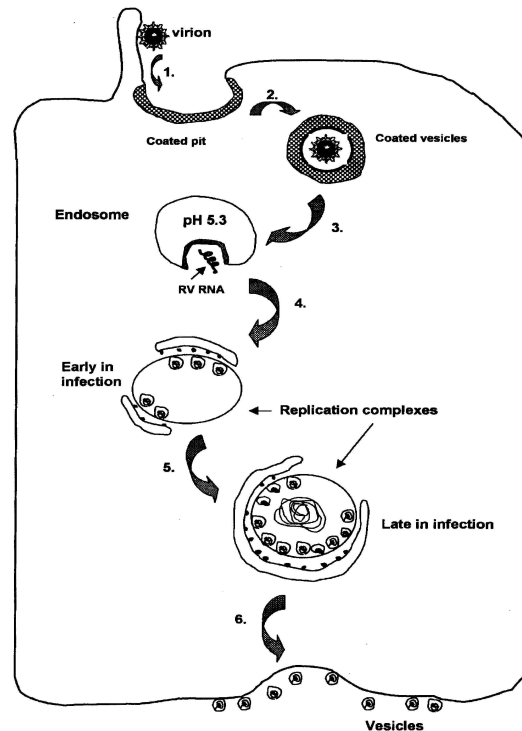


Figura 3. Esquema del ciclo de replicación del RUBV, con la unión del virión a la célula, entrada mediada por endocitosis, desencapsidación, replicación y producción de macromoléculas virales en el citoplasma y gemación a través del RER, aparato de Golgi y membrana plasmática celular (105).

1.3 PATOGENIA

La transmisión del virus puede ser horizontal, de persona a persona por vía respiratoria a través de inhalación de aerosoles (rubéola postnatal) y vertical, a través de la placenta, durante la viremia materna (rubéola prenatal o congénita). Los humanos son los únicos hospedadores conocidos del RUBV (18, 40, 131, 192).

1.3.1. Rubéola adquirida postnatalmente.

La rubéola aguda cursa como una infección aguda y autolimitada que ocurre usualmente en la niñez y en adultos jóvenes (40, 192). El RUBV penetra a la vía respiratoria por medio de aerosoles y se replica inicialmente en la mucosa de la nasofaringe (18), detectándose en muestras de la nasofaringe desde una semana antes de la aparición de los síntomas (exantema y fiebre)

hasta dos semanas después, con una excreción máxima entre 1-5 días después del exantema (39, 40, 131, 192). El paciente es infeccioso y excreta virus desde el inicio de la infección hasta 1 ó 2 semanas después de aparecer el exantema. El periodo de incubación tiene un rango entre 12 y 23 días, con una media de 18, y precede a la aparición del exantema (39, 40, 72, 105, 131, 192). Desde la mucosa respiratoria se disemina a los nódulos linfáticos de la nasofaringe y del tracto respiratorio superior (18, 105, 192), apareciendo las características adenopatías postauriculares y cervicales acompañadas por fiebre. Posteriormente, pasa al torrente sanguíneo en una primera viremia 5 a 7 días después de la exposición (40, 192), alcanzando hígado y bazo donde se replica para producir una segunda viremia tras que se inicia la excreción en orina (40). También, alcanza la piel y las mucosas, originando el exantema característico (40, 92, 105, 184). La presencia del virus en suero es relativamente corta y desaparece con la aparición de anticuerpos neutralizantes en sangre (40, 131). Estudios serológicos han mostrado que alrededor del 20 al 50% de las infecciones de rubéola ocurren sin exantema, sólo se produce enfermedad febril aguda, o son asintomáticas (39, 192). Las manifestaciones agudas de la enfermedad difieren en los diferentes grupos de edad, con infecciones en adultos más severas que en niños (17, 39).

1.3.2 Rubéola congénita.

La infección prenatal ocurre solo tras la primoinfección de una mujer embarazada (39), durante el periodo de viremia (18, 40, 131) (Figura 4), dando lugar a la necrosis de áreas distribuidas focalmente en el epitelio de los vellos coriónicos y en las células endoteliales de sus capilares (18). Se ha visto que estas células se descaman dentro del lumen de los vasos, sugiriendo que el RUBV es transportado al feto dentro de estas células endoteliales infectadas (18). Tras ser transmitido al feto a través de la placenta, el virus infecta los tejidos fetales provocando malformaciones durante la organogénesis, ocasionando así el SRC (Figura 7) (18, 40, 105, 131, 192). La infección por el RUBV conduce a malformaciones con más frecuencia durante las primeras 8 semanas de gestación, disminuyendo

mucho la frecuencia durante los dos últimos trimestres del embarazo (105, 131, 137). Se ha estimado que el feto tiene un 67-90% de posibilidades de desarrollar defectos asociados a la infección por el RUBV, si la madre se infecta en los dos primeros meses de embarazo, decayendo el riesgo a un 30-35% en el tercer mes de gestación y a un 10% durante el cuarto, pero aumenta cuando se acerca el parto (18, 39, 40, 72, 105, 131, 146, 184, 192). Esta diferencia de riesgo y gravedad de la infección fetal puede ser debido a que el sistema inmune del feto, en los primeros meses de gestación, aún está inmaduro (18, 131).

Algunos trabajos han mostrado que en los fetos o niños afectados, el número de células en los órganos es más bajo que en niños saludables (18). Se ha manifestado que hay dos rasgos distintivos de la replicación del RUBV, que afectan notablemente a la función de las células del hospedador normal que son las anomalías mitocondriales y la destrucción del citoesqueleto. También, se ha visto la capacidad del RUBV para inducir la apoptosis (18, 105).

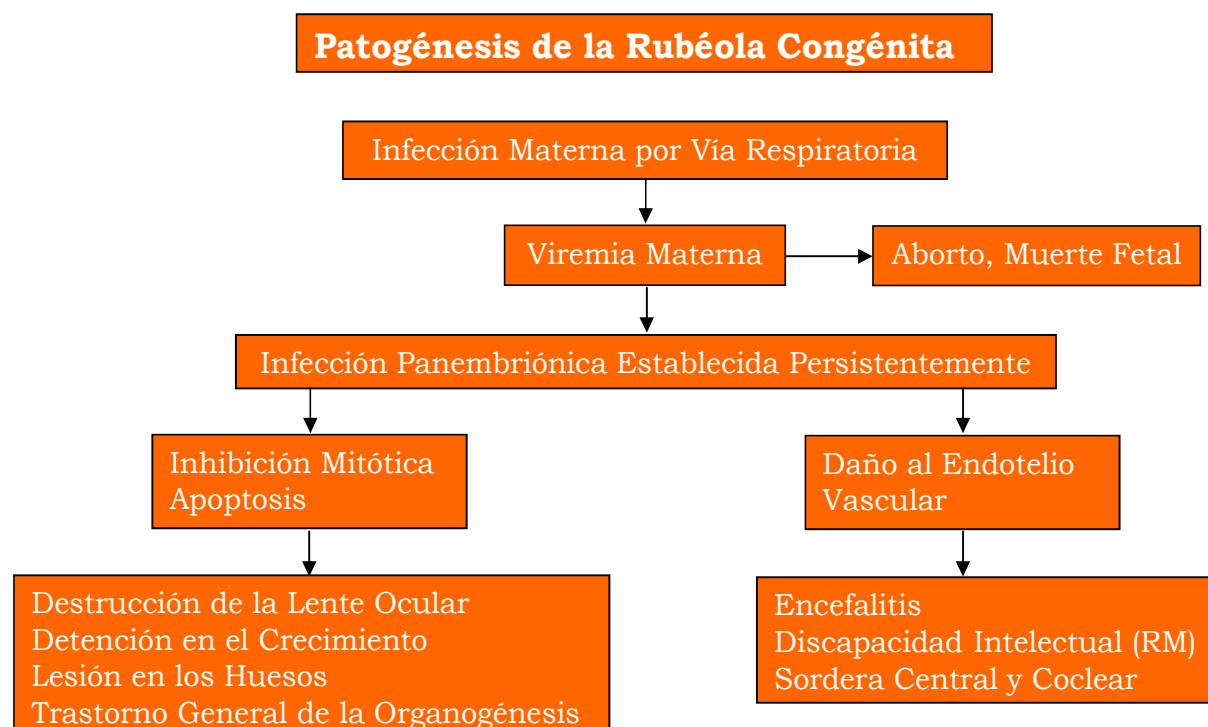


Figura 4. Patogénesis de la Rubéola Congénita (137).

1.4 RESPUESTA INMUNE

1.4.1 Inmunidad humoral.

La primera respuesta serológica detectable tras la infección por el RUBV, es la presencia de anticuerpos de clase inmunoglobulina M (IgM), presentes casi siempre desde el momento de la aparición del exantema hasta un mes o dos después de la infección aguda (Figura 5) (72). Por ello, la prueba serológica para la detección de IgM anti-RUBV, es el método principal para el diagnóstico de la infección aguda por RUBV (72). En las semanas siguientes aparecen el resto de las inmunoglobulinas. La respuesta de inmunoglobulina G (IgG) predominante tras la infección primaria es de clase IgG1 y los anticuerpos de este tipo persisten indefinidamente después de la infección natural en individuos sanos (Figura 5) (72). Los anticuerpos IgG detectados en los momentos tempranos de la infección primaria, son de baja avidéz y maduran gradualmente en los siguientes tres meses (40, 51). La detección de esta IgG de baja avidéz complementa a la de IgM específica para el RUBV en el diagnóstico de la infección primaria (40, 113) y es la base de los ensayos confirmatorios. Esto es de particular importancia cuando se sospecha de una infección en el primer trimestre del embarazo si se considera la posibilidad de realizar un aborto terapéutico, de acuerdo a la legislación vigente sobre interrupción del embarazo (40).

Una gran parte de las inmunoglobulinas parecen estar dirigidas frente a la glicoproteína E1, con cantidades proporcionalmente menores frente a E2 o C (40, 72). Los varones pueden tener una respuesta más rápida y una mayor producción de anticuerpos que las mujeres, pero éstas producen una respuesta anti-E2 más fuerte (40).

Aunque hay algunas variaciones de criterio en cuanto a la concentración de anticuerpos IgG que se considera protectora, el valor más comúnmente aceptado es ≥ 10 UI/ml (192).

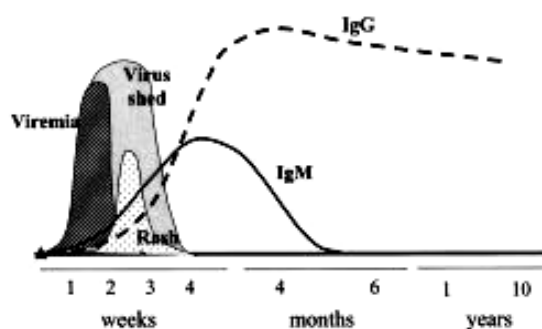


Figura 5. Diagrama representando el curso de la infección aguda de la rubéola desde el inicio de la infección. Resaltar que el exantema, que es el primer signo visible de la infección, aparece después de la 2ª semana del inicio de la infección y dura alrededor de 2 a 10 días (40).

1.4.2 Inmunidad celular.

La respuesta de células T específicas contra el RUBV empieza una semana después de la respuesta humoral, y parece persistir durante toda la vida, pero a niveles bajos (40, 72, 192). El desarrollo de la respuesta inmune celular específica contra el RUBV, puede ser medida *in vitro* durante una o dos semanas después de la aparición de los síntomas clínicos (40, 146). Los epítomos a los que se dirigen las células T CD4+ están restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y han sido mapeados para las tres PE, sin embargo, los epítomos de las células T CD8+ solo han sido mapeados para la proteína C (72).

1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1.5.1 Infección aguda.

La infección causada por el RUBV durante la vida escolar o adulta es frecuentemente leve, con muchos casos que pasan como eventos subclínicos o asintomáticos (40, 72, 192). Esta infección se caracteriza clínicamente por una combinación de síntomas que incluye un exantema maculopapular, adenopatías, fiebre baja ($\leq 39^{\circ}\text{C}$), conjuntivitis y artralgia (40, 72, 192). El exantema es una de las manifestaciones iniciales de la enfermedad en cerca del 50-80% de todas las personas que manifiestan sintomatología por el RUBV (Figura 6) (40, 192). Este exantema se inicia como maculopápulas rosadas en la cara (muy distintivas), que luego se diseminan por todo el

tronco y, de manera distal, por las extremidades (40, 72, 192). Estos síntomas suelen remitir en pocos días y raramente se acompañan de síntomas más significativos, como artropatía, trombocitopenia, encefalopatía (40, 72, 192). La encefalitis post-infecciosa ocurre aproximadamente en 1/6.000 casos de rubéola (40, 192), pero ocasionalmente han sido reportadas incidencias tan altas como 1/500 a 1/1.600 (192). La poliartralgia aguda y la artritis posteriores a una infección natural por el RUBV, son usualmente de corta duración en adultos, y ocurren con mayor frecuencia y gravedad en el 70% de las mujeres infectadas, siendo menos comunes en hombres y niños (40, 72, 192). Sin embargo, la artritis crónica persistente o recurrente aparece ocasionalmente después de varios años de la infección (72, 184). Por otro lado, es muy raro observar manifestaciones hemorrágicas o síndrome de Guillain-Barré (192) y también es muy infrecuente la aparición de Panencefalitis Progresiva por RUBV (PPR), aunque es una complicación inevitablemente fatal, desarrollándose preferentemente en la segunda década de la vida de niños con SRC (184).



Figura 6. Exantema maculopapular, es el síntoma clínico más importante de la infección aguda por el RUBV ([http://www. http://vacuven2.blogspot.com/2012/04/rubeola-brote-en-guarderia-alerta.html](http://www.vacuven2.blogspot.com/2012/04/rubeola-brote-en-guarderia-alerta.html)).

1.5.2 Síndrome de rubéola congénita.

Aunque la rubéola aguda está asociada ocasionalmente con complicaciones graves, la infección de un feto en desarrollo por transmisión transplacentaria del RUBV, tiene consecuencias graves para su desarrollo (72). Después de la

concepción, las malformaciones ocurren en el 67-90% de los casos, si la madre se infecta en los dos primeros meses de embarazo, decayendo el riesgo a un 30-35% en el tercer mes de gestación y a un 10% durante el cuarto, pero aumenta cuando se acerca el parto (18, 39, 40, 72, 105, 131, 146, 184, 192).

La infección del tejido fetal produce distintos efectos. La infección muy temprana puede conllevar a la reabsorción del embrión (40). Se conjetura que la infección únicamente de la placenta puede llevar a abortos espontáneos o anomalías en el desarrollo del feto. La rubéola materna es un supuesto legalmente reconocido de aborto terapéutico, particularmente cuando la infección ocurre durante las primeras 8 a 10 semanas de gestación, que es cuando la probabilidad de defectos en el neonato es extremadamente alta (67-90%) (18, 40, 72, 105, 146, 192). La vacuna de rubéola, RA27/3, tiene un efecto teratogénico extremadamente bajo y la aplicación accidental a una mujer embarazada ya no se considera una indicación de aborto terapéutico (40).

Las manifestaciones clínicas más comunes del SRC (presentes en al menos un 10% de los pacientes) incluyen la pérdida de audición, cardiopatía congénita, retraso psicomotor, cataratas o glaucoma, retinopatía, púrpura trombocitopénica neonatal, hepatomegalia y esplenomegalia, y retraso del crecimiento intrauterino (18, 40, 72, 105, 146) (Tabla 1; Figuras 4 y 7). Las manifestaciones menos comunes (presentes en el 5-10% de los pacientes) incluyen hepatitis (en general con ictericia) y anemia hemolítica (18, 40, 72, 105, 146) (Tabla 1). Cerca del 20% de los niños con SRC desarrollan diabetes mellitus tipo I cuando llegan a ser adultos jóvenes (184).

Muchas manifestaciones de la rubéola congénita son evidentes poco después del nacimiento y en algunos casos son transitorias (72). Sin embargo, la aparición de retinopatías, pérdida de audición y retardo mental puede retrasarse en algunos casos, hasta varios años después del nacimiento (40, 72).



Figura 7. Niño con Síndrome de Rubéola Congénita (40).

Tabla 1. Rasgos Clínicos Prominentes del Síndrome de Rubéola Congénito (137).

<i>Rasgos Clínicos</i>
Encefalitis
Microcefalia
Retardo mental
Autismo
Sordera coclear
Sordera auditiva central
Retinitis
Cataratas
Microftalmia
Glaucoma
Persistencia del conducto arterial
Estenosis de la arteria pulmonar periférica
Retardo del crecimiento intrauterino
Hepatoesplenomegalia
Neumonitis intersticial
Púrpura trombocitopénica
Diabetes mellitus tipo I
Hipotiroidismo

1.5.3 Enfermedad neurológica retardada.

Una complicación inusual es la PPR, la cual se caracteriza por un período asintomático prolongado, seguido de síntomas de deterioro neuronal durante la segunda década de la vida. Se producen asimismo, cambios del comportamiento, deterioro intelectual, ataxia, espasticidad y, a veces,

convulsiones. La muerte se produce en aproximadamente 8 años. Aunque esta enfermedad se asocia más a menudo con SRC en niños y jóvenes, también puede ser una complicación muy rara de la rubéola aguda en niños (40).

1.6 DIAGNÓSTICO

1.6.1 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial básico incluye exantema por sarampión (MeV), roséola, eritema infeccioso, y exantemas por enterovirus (EV) y adenovirus (AdV). En una serie de pacientes con exantemas rubeliformes y artritis o artralgia, la rubéola sólo fue confirmada en 36% de los casos (40). De los casos restantes, un 7% fueron atribuidos a infecciones por el parvovirus B19V (B19V) y 57% fueron de etiología desconocida (40). Las infecciones por B19V causan típicamente un exantema rubeliforme y artralgias, especialmente en adultos, e infecciones por el dengue (DENV) puede ser confundido con rubéola en áreas endémicas (40). Por ello, un diagnóstico definitivo de rubéola debe hacerse sólo por estudios de laboratorio (18, 40, 192).

De la misma manera, no puede establecerse el diagnóstico de la rubéola congénita solamente por los hallazgos clínicos, tiene que ser confirmado en el laboratorio (18, 40, 192).

1.6.2 Diagnóstico de laboratorio.

El diagnóstico de la rubéola posnatal normalmente se lleva a cabo serológicamente por la detección de IgM anti-RUBV o la demostración de un incremento significativo de IgG anti-RUBV en muestras de sueros pareados, agudo y convaleciente, por enzimoimmunoanálisis (ELISA), los cuales proveen evidencia de una infección reciente por este virus (18, 192). Los niños infectados intra-uterinamente producen IgM anti-RUBV durante muchos meses después del nacimiento (18, 40). Aunque las pruebas de IgM anti-RUBV son altamente sensibles, su especificidad puede estar comprometida por reactividades heterólogas con otros virus (especialmente

con el B19V y el virus de Epstein-Barr-EBV) (18, 40) o por la presencia de factor reumatoide (18, 40). La confirmación de la infección por el RUBV en muestras positivas a IgM, se ha realizado durante muchos años por seroconversión, pero actualmente, la medida de IgG anti-RUBV de baja avididad constituye una prueba alternativa para el diagnóstico de la infección reciente en la misma muestra (18, 40), utilizándose en muchos laboratorios de países desarrollados.

Otras pruebas serológicas diagnósticas incluyen la inhibición de la hemaglutinación (IHA) o la técnica de detección de anticuerpos neutralizantes, pero estas pruebas son laboriosas y actualmente se utilizan muy poco (40).

Ocasionalmente se emplea el aislamiento viral, particularmente para confirmar la infección durante el embarazo o en un neonato (40, 192). En infecciones agudas, los virus pueden aislarse rápidamente desde secreciones nasofaríngeas entre seis días antes y seis días después de la aparición del exantema (40). Sin embargo, el aislamiento viral es muy laborioso y costoso, y no se utiliza habitualmente para el diagnóstico de rutina de la rubéola postnatal (40, 184, 192), pero sí es importante para el diagnóstico del SRC, donde el virus puede aislarse de hisopado faríngeo, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o leucocitos de niños nacidos con SRC (184). El aislamiento en cultivo celular, proporciona virus vivo permitiendo una caracterización más profunda del fenotipo de las cepas implicadas en los brotes, casos esporádicos y SRC.

También se ha desarrollado la técnica de la amplificación de ácidos nucleicos para la detección de ARN del RUBV en muestras clínicas (40, 121, 192). Esto incluye la transcripción inversa (RT) del ARN viral, seguido por la amplificación por PCR del ADN complementario con oligonucleótidos específicos para el genoma del RUBV (18, 24, 40, 85, 121, 144, 168, 179). Muchas de estas amplificaciones son RT-PCR anidada, que incluye una segunda amplificación con un juego de oligonucleótidos específicos e internos a los oligonucleótidos de la primera reacción, para mejorar la sensibilidad de la prueba (26, 35, 87, 121, 144, 179). La secuenciación de los productos amplificados provee la confirmación de la identidad de los

productos como específicos del RUBV y también permite determinar el genotipo de la cepa circulante (9, 64, 87, 202). En los casos de sospecha de infección congénita suele darse el diagnóstico intrauterino usando la RT-PCR sobre muestras obtenidas por amniocentesis, cordocentesis o muestreando el vello coriónico (18, 40). La detección del ARN del RUBV en fluido amniótico por RT-PCR tiene una sensibilidad de 87-100% (18, 108). Esta técnica es sencilla y específica, y proporciona resultados mucho más rápidos que el aislamiento viral (40, 192).

Es conocido que las pruebas moleculares son más sensibles que las pruebas serológicas (8), específicamente en muestras de sueros entre los días 1 y 2 después de inicio de síntoma, pero en estudios previos a esta tesis, se observó una baja sensibilidad de la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos de uso en el Centro Nacional de Microbiología (CNM) en muestras clínicas de un brote de RUBV, comparada con la prueba serológica de anti-IgM específica (Figura 14) (122, 154). Esto también fue observado por otros autores con ensayos de PCR diferentes (57, 203). Además con esta misma PCR múltiple, se observó una alta sensibilidad en la detección de MeV, igualmente en el contexto de un brote de Almería de 2003 (123). Todo ello sugería que esta técnica debía de ser mejorada para la detección del RUBV.

1.7 EPIDEMIOLOGÍA

1.7.1 Incidencia.

La rubéola es endémica a nivel mundial, con picos estacionales regulares que ocurren en los meses de primavera en climas templados (40, 72), mientras que en ciudades tropicales este ritmo estacional no es tan marcado. Por otra parte, la ausencia de síntomas clínicos significativos en un porcentaje elevado de casos, puede ser causa de que algunos brotes de pequeño tamaño puedan pasar desapercibidos (18, 40, 72, 105). Antes de la utilización de la vacuna, los picos epidémicos de la rubéola ocurrían a intervalos de 5 a 9 años (72). Actualmente, en los países con alta cobertura

vacunal se producen pequeños o, a lo sumo, medianos brotes epidémicos debido a la presencia de bolsas de personas susceptibles (87, 109, 177).

1.7.2 Edad.

Hay una variación geográfica considerable en la tasa de ataque del RUBV en diferentes grupos de edad (72). La edad en la cual la rubéola es adquirida naturalmente en el mundo industrializado ha cambiado desde la introducción de la vacunación universal, que se administra en la edad infantil entre los 12 a 18 meses. Antes de esta introducción, en países desarrollados templados, el pico de la tasa de infección ocurría en niños entre 5 a 9 años (40, 72). En áreas de alta cobertura vacunal sostenida, la edad media de los casos se incrementa progresivamente, debido a que la población infantil va alcanzando un mayor nivel de inmunización. La vacunación también alarga el periodo interepidémico. Con mayor probabilidad los brotes son locales, en contraste con las extensas epidemias producidas en poblaciones prevacunales. En países en desarrollo, donde la vacuna de la rubéola no fue introducida de manera sistemática hasta finales de la década de los 90, como ocurre en gran parte de Latinoamérica (53) o no es administrada de manera consistente, se produce una situación intermedia en la que muchas mujeres no vacunadas alcanzan la edad fértil sin haber contraído la infección natural permaneciendo susceptibles (40, 72, 137), y produciendo una alta incidencia del SRC durante los brotes de rubéola, entre 1-2 por 1.000 nacidos vivos (18, 40, 105, 146). También, en algunos países desarrollados como España, las cohortes de varones nacidos antes de la introducción de la vacuna triple vírica (TV) a principio de los años 80 y que no fueron inmunizados en las campañas previas centradas únicamente en niñas de 11 años (1), se convierten en bolsas de personas susceptibles a la infección del RUBV.

1.7.3 Origen y diseminación de las epidemias.

Los humanos son los únicos hospedadores naturales conocidos del RUBV (40, 72). La enfermedad se transmite a partir de los individuos infectados sintomáticos y asintomáticos, por vía respiratoria. Se trata de una

enfermedad moderadamente contagiosa. Los niños infectados congénitamente excretan grandes cantidades de virus durante muchos meses o años y representan una fuente potencial de infección (40, 72). La persistencia de grupos de individuos susceptibles explica la aparición de epidemias a intervalos de 3 a 9 años, en diferentes partes del mundo en grupos susceptibles sin vacunación (87, 109).

1.7.4 Epidemiología molecular.

En el 2004, representantes de la Red Global de Laboratorios de Sarampión y Rubéola de la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrollaron una nomenclatura uniforme para la clasificación de las cepas salvajes del RUBV donde describen 10 genotipos: siete reconocidos y tres provisionales (193). En el 2007, estas recomendaciones fueron actualizadas, describiéndose ahora 13 genotipos: nueve reconocidos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 2A, 2B y 2C) y cuatro provisionales (1a, 1h, 1i y 1j), de los que se dispone de secuencias genómicas de referencia, publicadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabla 2) (195). Todos los genotipos reconocidos deben estar representados por un mínimo de dos virus de referencia bien caracterizados para los cuales debe de haber sido secuenciada la unidad de transcripción de las PE completa (10). La OMS recomienda asignar el genotipo de RUBV de una muestra clínica o aislado por secuenciación de una ventana o fragmento mínimo de 739 nt del gen E1 (nt 8731-9469) y comparación con las secuencias de los virus de referencia (10, 193, 195).

Tabla 2. Cepas de referencia de genotipos de RUBV actualizado por la OMS en el 2007 (195).

Genotipo	Nombre de la Cepa de Referencia	Nombre Anterior	Número de Acceso a GenBank
1a	Rvi/PA.USA/64[1a]VAC	RA27/3 US 64	L78917
	Rvi/NJ.USA/61[1a]VAC	HPV77 US 61	M30776
	Rvi/BEL/63[1a]VAC	Cendehill BEL 63	AF188704
	Rvi/Toyama.JPN/67[1a]VAC	TO-336 WT JP 67	AB047330
1B	RVi/Jerusalem.ISR/75[1B]	I-9 IS 75	AY968207
	RVi/Tiberias.ISR/88[1B]c	I-34 IS 88	AY968209
	RVi/BeneBerak.ISR/79[1B]c	I-13 IS 79	AY968208
1C	RVi/Los Angeles.USA/91[1C]	BUR US 91	AY968212
	RVi/SLV/02[1C]	QUI ELS 02	AY968211
	RVi/PAN/99[1C]	P-31 PAN 99	AY968217
1D	RVi/Tokyo.JPN/90[1D]CRS	NC JP 90	AY968214
	RVi/Saitama.JPN/94[1D]	SAI-1 JP 94	AY968216
1E	RVi/Dezhou.CHN/02[1E]c	T14 CH 02	AY968210
	RVi/MYS/01[1E]	M-1 MAL 01	AY968221
1F	Rvi/Linqing.CHN/00[1F]c	TS10 CH 00	AY968213
	RVi/Dangshan.CHN/00[1F]c	TS 38 CH 00	AY968215
1G	Rvi/UGA/20.01[1G]		EF588978
	Rvi/Ontario.CAN/27.05[1G]		EF588970
	RVi/Minsk.BLR/29.04[1G]		AM258945
1h	Rvi/Minsk.BLR/28.05/2[1h]		AM258953
	Rvi/Tomsk.RUS/05[1h]		DQ454161
1i	Rvi/Milan.ITA/46.92[1i]	4655	AY161360
	Rvi/Pavia.ITA/21.91[1i]	3988	AY161352
1j	RVs/Miami.FL.USA/32.02[1j]	DRU FL 02	EF602117
	Rvi/Tochigi.JPN/04[1j]		AB238919
2A	RVi/Beijing.CHN/79[2A]	BRD1 CH 79	AY258322
	RVi/Beijing.CHN/80[2A]VAC	BRD2 CH 80	AY258323
2B	RVi/TelAviv.ISR/68[2B]	I-11 IS 68	AY968219
	Rvi/Seattle.USA/16.00[2B]	TAN IND 00	AY968220
	RVi/Anqing.CHN/00/2[2B]	TS34 CH 00	AY968218
2C	Rvi/Moscow.RUS/67[2C]	C4	DQ388279
	Rvi/Moscow.RUS/97[2C]	C74	DQ085340

c Aislamiento de un paciente con rubéola congénita.

Se han reconocido dos grupos filogenéticos: 1 y 2 (10, 40, 71, 193, 195). El grupo 1, está distribuido a nivel mundial y lo comprenden 10 genotipos, de los cuales seis son reconocidos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F y 1G) y cuatro son provisionales (1a, 1h, 1i y 1j) (10, 193, 195). El grupo 2, está conformado por tres genotipos reconocidos (2A, 2B y 2C) (10, 193, 195), pero están más restringidos a Asia y Europa (95, 192, 193). Los dos grupos (1 y 2) difieren entre sí un 8-10% a nivel de nt (10, 40, 193), con variaciones dentro de cada genotipo de aproximadamente un 2% (40, 193). Esto solo se traduce en una variación de un 1-3% de sustituciones de aa en la proteína E1, reflejando un alto grado de conservación genética entre las cepas del RUBV (40, 71, 105).

1.7.4.1 Criterios para Reconocer un Genotipo.

Estos criterios fueron extraídos del documento para la Estandarización de la Nomenclatura para la Caracterización Genética de Cepas del RUBV salvaje realizado por expertos de la OMS en 2004 (193).

- a. Deben estar disponibles al menos dos virus de referencia, que deben haber sido enviados al banco de cepas de la OMS.
- b. Debe estar disponible la secuencia de toda la unidad de transcripción correspondiente a las PE (región que codifica para las proteínas C, E2 y E1) de los dos virus de referencia del genotipo.
- c. El análisis filogenético de los virus de referencia del genotipo junto con los de otros genotipos deben mostrar que:
 - i. Los virus de referencia del genotipo deben agruparse entre sí y separadamente de los de todos los otros genotipos, con un alto valor de confianza (ej. valor de *bootstrap* entre 80 y 90%). Este agrupamiento debe ser obtenido con un mínimo de 2 métodos de análisis diferentes;
 - ii. La topología del árbol filogenético obtenida con la secuencia de toda la unidad de transcripción completa de los genes de las PE de los virus del genotipo y de los otros virus de referencia, debe ser la misma que la obtenida con las secuencias que codifican los genes de las proteínas C, E2 y E1 individualmente;

- iii. La distancia intra e intergenotipo para los virus de referencia en el nuevo genotipo deben ser consistentes con la distancia de los genotipos ya existentes;
 - iv. El patrón de ramas obtenido en el análisis filogenético conjunto con el resto de los virus de referencia, debe ser consistente con un nuevo genotipo.
- d. Los datos de secuencia de los virus de referencia del genotipo nuevo deben ser depositados en GenBank, incluyendo el nombre oficial de la cepa y acompañada con datos clínicos y epidemiológicos (ver la convención para nombrar las cepas en la sección 1.7.4.2)

1.7.4.2 Nomenclatura de cepas.

El Sistema de nomenclatura de cepas debe incluir la información epidemiológica esencial para la interpretación de los datos moleculares. La secuencia puede derivarse de un aislamiento viral en cultivo celular o directamente de material clínico. La nomenclatura será diferente en cada caso:

- RVi: secuencia de RUBV procedente de un aislamiento en cultivo celular; o
- RVs: secuencia de RUBV derivada de ARN extraído directamente desde muestra clínica.

Otra información necesaria:

- a. Se exige incluir el nombre de la ciudad del aislamiento, utilizando el nombre completo o la abreviatura;
- b. También se requiere el nombre del país utilizando las tres letras designadas para cada país por la Organización Internacional de Estandarización;
- c. Es obligatorio mencionar la fecha de colección de la muestra por semana epidemiológica (1 a 52) y el año;
- d. Opcionalmente, se puede indicar el número de aislamiento si hay más de un aislamiento por semana;
- e. El genotipo (que inicialmente era opcional, es ahora preciso después de secuenciar la ventana de 739 nt de la región codificante de la E1);

f. Opcionalmente, se puede citar la designación especial para las secuencias derivadas de los casos de SRC.

Los siguientes ejemplos ilustran lo propuesto por la convención para nombrar las cepas de RUBV:

- RVi/Tokyo.JPN/03.98/2[1D]
- RVs/London.GBR/17.97[1B]CRS

Cuatro de los 13 genotipos del RUBV no fueron reportados entre enero del 2005 y mayo del 2010. Tampoco ha sido aislado virus del genotipo 2A desde 1980, a excepción de algunos casos de la cepa vacunal 2A de China, BRDII. Los virus del genotipo 1i y 1F fueron encontrados por última vez en Italia (1994) y China (2002), respectivamente. El genotipo 1D no ha sido detectado desde 1996. De los nueve genotipos activos durante este periodo, seis (1a, 1B, 1C, 1h, 1j y 2C) fueron reportados esporádicamente o en regiones muy restringidas (10). Por ejemplo, el genotipo 1h fue detectado solo en Rusia y países cercanos (10) y el genotipo 2C fue encontrado solo en Perm, Rusia (GenBank). No se ha reportado virus del genotipo 1C en las Américas durante casi cinco años de vigilancia virológica (Tabla 3) (91).

Los virus pertenecientes a tres genotipos, 1E, 1G y 2B, han tenido una distribución geográfica amplia y fueron encontrados frecuentemente (10). Los virus del genotipo 1E han sido identificados en el Oriente Medio, Europa, Sureste de Asia, África, Pacífico Occidental y es el genotipo dominante en China (Tabla 3) (10, 26, 44, 46, 89, 117, 126, 178, 182, 199-201). Los virus del genotipo 1G fueron encontrados en Europa, Suramérica y África (10, 26, 46, 66, 67, 87, 89, 178, 197, 200). Los virus del genotipo 2B fueron encontrados en Oriente Medio, Europa, Sureste de Asia, Sur y Centroamérica, tres países de África y Pacífico Occidental (10, 15, 26, 46, 66, 89, 126, 136, 175, 177, 178, 198, 200, 201).

Aunque la vigilancia virológica de las cepas salvajes del RUBV es todavía incompleta a nivel mundial se puede tener una idea de la distribución global y de los genotipos dominantes (Figura 8) (Tabla 3) (186).

Tabla 3. Distribución Global de los Genotipos Circulantes del RUBV desde el 2005 al 2010.

<i>Genotipo</i>	<i>País</i>	<i>Año(s)</i>
1a	Camboya	2009
	Japón	2008
	Kazakhistán	2006
1B	Sudáfrica	2007, 2008
1C	Chile	2005
	Perú	2005
1E	Bielorusia	2005, 2006
	China	2005, 2006, 2007, 2008 ^a , 2009, 2010 ^a
	China, Hong Kong	2008, 2009, 2010
	Francia	2005 ^a
	Kazakhistán	2006
	Laos	2009
	Malasia	2005 ^b
	Mongolia	2010
	Polonia	2007, 2008 ^b
	Rusia	2005, 2006, 2007, 2008, 2010
	Sudáfrica	2008
	Sri Lanka	2008
	Sudán	2005
	Tailandia	2005, 2009
	Túnez	2008
	Ucrania	2007
	Reino Unido	2008
	Estados Unidos	2008 ^c
	Vietnam	2007 ^b
	Yemen	2008
1G	Argelia	2007

	Bielorusia	2005
	Ghana	2005, 2008
	Costa de Marfil	2005 ^b , 2008
	Kenia	2005, 2010 ^b
	Libia	2009
	Holanda	2005 ^a
	Rusia	2005 ^b , 2006, 2008
	Sudán	2005
	Uganda	2007 ^b
	Ucrania	2009
	Reino Unido	2007
1h	Bielorusia	2005, 2006
	Kazajistán	2008 ^a
	Kirguizistán	2009
	Rusia	2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010
1j	Brasil	2005 ^c
	Filipinas	2010 ^a
	España	2005 ^c
	Reino Unido	2006 ^c
	Estados Unidos	2010 ^c
2B	Argentina	2008
	Bangladesh	2009
	Bosnia y Herzegovina	2009, 2010
	Brasil	2006, 2007, 2008, 2010
	Chile	2007
	China	2008
	China, Hong Kong	2008, 2009
	Dubai	2009 ^b
	Egipto	2007 ^b
	Francia	2009

	India	2005, 2007, 2008 ^b , 2010 ^b
	Italia	2008 ^b
	Japón	2007 ^c
	Kazajistán	2008 ^{b,c}
	México	2008 ^b
	Nepal	2008, 2009, 2010
	Rusia	2009 ^c
	Sudáfrica	2007, 2008
	España	2008
	Sri Lanka	2008
	Sudán	2006
	Ucrania	2010
	Reino Unido	2006, 2007, 2008, 2010
	Estados Unidos	2007 ^c , 2009 ^c , 2010 ^c
	Vietnam	2006 ^b , 2009
	Yemen	2008
2C	Rusia	2005

^a Encontrado endémicamente y como cepa exportada. ^b Virus exportado. ^c Probablemente importado, pero el posible origen es desconocido (10).

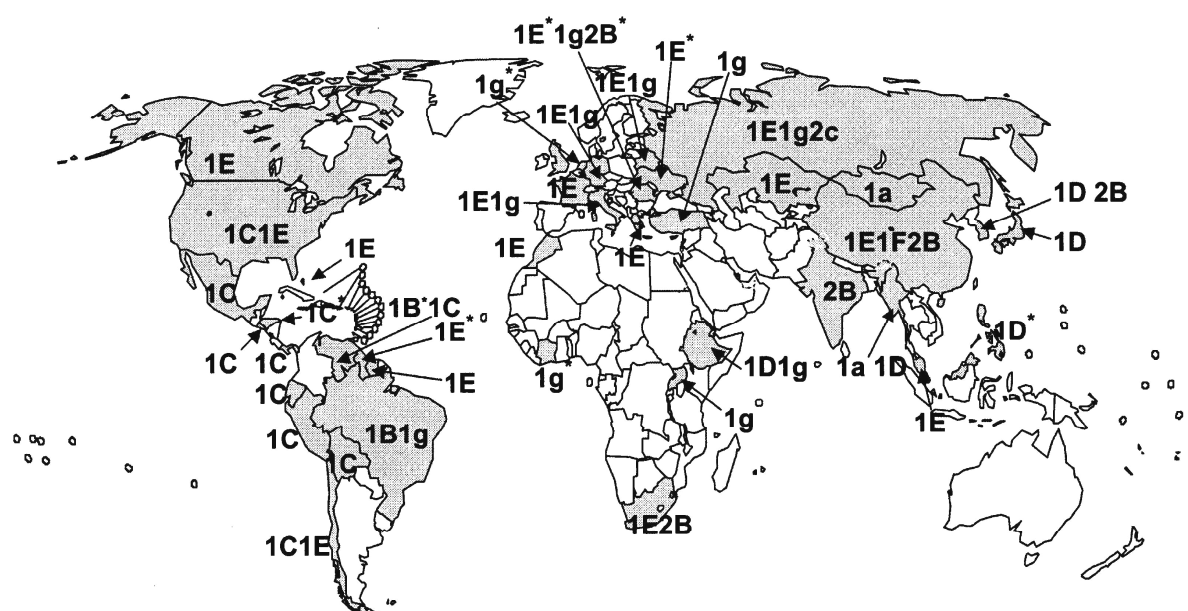


Figura 8. Distribución mundial del RUBV desde 1995 a 2006 (186).

1.8 PROFILAXIS. VACUNA TRIPLE VÍRICA

En España, la vacuna de la rubéola monovalente se introdujo en 1979, cuando fue administrada de manera selectiva en niñas escolares de 11 años de edad, con el objetivo principal de reducir el SRC (14, 106). En 1981, se incluye en España una dosis de la vacuna TV para todos los niños a los 15 meses de edad como parte del calendario general obligatorio. En 1996, se incluye una segunda dosis a los 11 años en toda España (5), que en 1999 fue adelantada a los 4 años de edad (2). Según el calendario vacunal del Ministerio de Sanidad del 2013, se ha variado recientemente las recomendaciones en el sentido de que la primera dosis de la vacuna TV se administre preferentemente a los 12 meses, aunque considera aceptable entre los 12 a 15 meses, y de que la segunda dosis se administre entre los 2 y 3 años, con preferencia a los 2 años (115).

La seroprevalencia del RUBV en la Comunidad de Madrid excede el 95% en todos los grupos de edad y aumenta al 98,6% entre las mujeres en edad fértil (16-45 años) (4, 56, 78, 155). Esto es así gracias a unas coberturas vacunales que superan el 95% para la primera dosis y el 90% para la segunda a nivel nacional (Tabla 4).

Tabla 4. Cobertura nacional con primera y segunda dosis de vacuna triple vírica (Sarampión-Rubéola-Parotiditis-SRP) desde 2003 hasta 2010 (111).

<i>Porcentaje de Vacunación desde 2003 hasta 2010</i>								
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Triple Vírica: Sarampión, Rubéola y Parotiditis (TV)								
Primera dosis:	97,7	97,3	96,8	96,9	97,1	97,8	97,4	95,2
niños de 1 a 2 años								
Segunda dosis:	91,2	95,7	96,8	94,1	94,9	94,4	90,4	91,8
niños de 3 a 6 años								

Sin embargo, el patrón es muy diferente en otras regiones del mundo como Latinoamérica, donde la rubéola permanece endémica en algunas áreas (10, 83). La vacuna de la rubéola sólo fue introducida en los países de

Latinoamérica a finales de los años 90, por lo que muchos inmigrantes adultos de estos países que viven en España, no están inmunizados. Estas circunstancias contribuyeron a que se produjeran varios brotes de rubéola en España, uno pequeño en el año 2003 (91, 153), otro mayor en los años 2004/2005 en Madrid y otro en Cataluña en el 2005 (1, 122, 173) entre inmigrantes latinoamericanos y varones españoles. También se produjo otro en el año 2008 en Algeciras-Cádiz (Andalucía), pero esta vez entre población autóctona no inmunizada.

1.8.1 Desarrollo de vacunas.

Después del primer aislamiento de la rubéola en cultivo celular en 1962, la atenuación del virus se llevó a cabo por pases seriados en una variedad de líneas celulares, obteniéndose varias cepas vacunales. La cepa HPV77/DE5 fue la de uso predominante en Norteamérica hasta 1979, cuando ésta fue reemplazada por la vacuna RA27/3 debido a la disminución de la inmunidad de los vacunados con la cepa HPV77/DE5 (40). Se ha publicado que la cepa RA27/3 induce una respuesta inmune más fuerte que HPV77/DE5 y tiene la ventaja añadida de ser una vacuna atenuada en células humanas disminuyendo los efectos asociados con vacunas aisladas en células no humanas (18, 40, 105). La cepa RA27/3 fue aprobada en 1979 y es la única vacuna de rubéola disponible para Norteamérica y Europa en estos momentos (18, 40, 105, 192), tanto en formulación monovalente como en combinación con el MeV y virus de la parotiditis (72, 192). Otras cepas vacunales atenuadas de la rubéola incluyen las cepas Takahashi, Matsuura y TO-336, las cuales se utilizan principalmente en Japón y la cepa BRD-2, que se utiliza en China (40, 72, 192). En muchos países, las cepas vacunales del RUBV están comúnmente combinadas con las del MeV (SR), y virus de la parotiditis en un preparado triple (SRP), y actualmente, con sarampión, paperas y varicela en uno cuádruple (SRPV) (72, 97, 137, 192). La combinación con otros virus no reduce su inmunogenicidad (137).

1.8.2 Pautas y vías de administración.

La vacuna de la rubéola contiene virus vivo atenuado. Cada dosis de las vacunas disponibles en España, contienen un número definido de unidades infecciosas de los tres virus (SRP) que es igual o mayor a 1.000 dosis infecciosas en cultivo de tejido (DICT) (192). Las diferentes presentaciones de las vacunas de rubéola deben ser conservadas entre 2-8°C y protegidas de la luz, para que puedan tener una vida media entre 2-3 años (192). En España existen tres presentaciones de la vacuna TV: Priorix® (GlaxoSmithKline, España) y Vacuna Triple MSD® (Sanofi Pasteur MSD). Se administra por vía subcutánea en la región externa del deltoides en un volumen de 0,5 ml una vez reconstituida, pero también puede ser administrada intramuscularmente (192).

En el 95% o más de los vacunados se produce seroconversión (72, 111, 163) entre 21 y 28 días tras la vacunación (111). Pese a que la tasa de respuesta a una sola dosis de la vacuna supera el 95% y se ha reportado protección entre 10 y 21 años después de la administración (127), se requiere una segunda dosis para asegurar una adecuada protección (192).

1.8.3 Contraindicaciones.

Ninguno de los más de 1.000 niños nacidos de madres inadvertidamente inmunizadas dentro de los primeros tres meses de gestación, mostraron malformaciones compatibles con el SRC (40, 72, 192). No obstante, debido al riesgo potencial, la vacunación durante el embarazo continúa contraindicada (33, 40, 72, 192). La vacunación inadvertida de una mujer embarazada seronegativa, no es considerada causa suficiente para el aborto terapéutico (18, 40, 72, 105, 137, 192). Sin embargo, las mujeres, deben esperar por lo menos un mes después de la vacunación antes de quedarse embarazadas (192).

Las personas con historia de reacciones anafilácticas a la neomicina, gelatina u otros componentes de la vacuna no deben ser vacunadas, así como las personas que sufren de una inmunodeficiencia severa, incluyendo sida, enfermedades inmunes congénitas, terapia inmunosupresora agresiva y cáncer. No hay evidencia de que la vacuna TV (SRP) suprima el sistema

inmune lo suficiente como para activar la tuberculosis latente o aumentar la tuberculosis activa. Sin embargo, no deben ser vacunadas las personas con tuberculosis activa hasta que terminen el tratamiento (192).

No hay contraindicaciones en administrar las vacunas SRP y SRPV a personas con inmunidad a uno o varios de sus componentes. Los anticuerpos contra el RUBV en sangre o preparaciones de inmunoglobulinas pueden interferir con la vacunación contra la rubéola (192).

Las infecciones concurrentes leves no son consideradas como contraindicaciones, pero la vacunación debe ser pospuesta si el paciente tiene fiebre mayor de 38,5°C u otros signos de enfermedad grave (192).

1.8.4 Efectos Secundarios.

Los efectos secundarios de la vacuna de rubéola RA27/3 incluyen con mucha frecuencia dolor, enrojecimiento y endurecimiento en el área de la inyección. Fiebre de bajo grado y exantema, irritabilidad, linfadenopatía, mialgia y parestesia, se han detectado con menos frecuencia aunque no son raros (192).

Los síntomas relacionados con enfermedades en las articulaciones son raros en niños (0 a 3%) y en hombres (72, 192). Se ha observado tasas del 25% de mujeres adultas susceptibles, que después de ser vacunadas con la vacuna RA27/3 desarrollan artritis o artralgia aguda, usualmente transitorias (40, 72, 137, 192). No se ha informado artritis crónica ni síntomas neurológicos después de la vacunación en mujeres adultas (72). En unos pocos individuos, las reacciones pueden ser recurrentes o persistentes, similares a los síntomas vistos cuando son infectados por cepas salvajes del RUBV (40). Estudios epidemiológicos amplios, no han podido demostrar la asociación entre la vacuna del RUBV y enfermedades crónicas en las articulaciones (192).

Se ha observado trombocitopenia en 1/30.000 vacunados con vacunas que contienen RUBV y MeV a diferencia de lo publicado de 1/3.000 casos por infecciones con cepas salvajes del RUBV. En una revisión de 31 ensayos controlados sobre los efectos de la vacuna TV concluyeron que la vacuna puede asociarse causalmente con púrpura trombocitopénica benigna,

parotiditis, complicaciones en las extremidades y en las articulaciones, y convulsiones por fiebre alta durante las 2 semanas posteriores a la vacunación (54). La anafilaxis después de la vacunación con la RA 27/3 es rara. No hay evidencia que demuestre la relación causal entre autismo y vacuna TV (192).

1.8.5 Futuro de la vacuna triple vírica.

La vacuna tetravalente combinada para prevenir el sarampión, la rubéola, la parotiditis y la varicela (SRPV) (ProQuad®, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, Estados Unidos de América-EEUU) fue aprobada por la *Food and Drugs Administration* (FDA), el 6 de septiembre de 2005 (97, 187), para ser administrada a niños entre 12 meses a 12 años de edad (187). Esta vacuna fue recomendada en 2006 por el *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP), para ser utilizada en lugar de la vacuna TV (SRP) y la vacuna monovalente de varicela por separado, con políticas de vacunación de 2 dosis (187). Se recomienda que la primera dosis se administre entre los 12 a 15 meses de edad y la segunda dosis entre los 4 a 6 años (187).

En estudios pre-licencia de la vacuna tetravalente se observó una mayor incidencia de fiebre, asociada a un mayor riesgo de convulsiones febriles y a la aparición de exantema morbiliforme, en niños de 12 a 23 meses de edad con la primera dosis de SRPV que cuando se administra por separado la vacuna TV (SRP) y la monovalente de varicela, incluso aunque se administren al mismo tiempo (Figura 9) (97, 187).

El 27 de febrero del 2008, se presentó ante el ACIP información adicional por parte del *Kaiser Permanent Vaccine Study Center* y del *Vaccine Safety Datalink* (VSD) (Washington, Colorado, Oregon, Massachusetts, Minnesota, Carolina del Norte y Wisconsin), acerca del mayor riesgo de convulsiones febriles en niños de 12-23 meses de edad que recibieron la vacuna SRPV (Figura 9), lo que ha llevado al ACIP a cambiar sus recomendaciones acerca de la vacuna. Así, si antes se abogaba por la introducción de la vacuna combinada SRPV, ahora se aconseja la administración de la vacuna TV (SRP) y la vacuna monovalente de varicela por separado (97, 187).

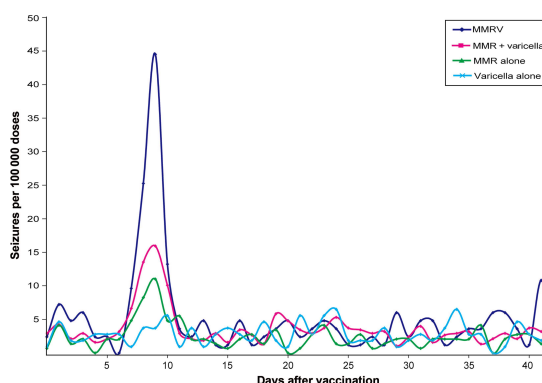


Figura 9. Convulsiones febriles postvacunación de pacientes externos entre 12 y 23 meses de edad de acuerdo a la vacuna recibida: Población en estudio VSD, 2000-2008 (97).

2. CONTROL DE LA RUBÉOLA

El RUBV es aún endémico en muchos países en desarrollo, aunque no siempre está disponible información actualizada sobre la incidencia de rubéola y, lo que es más importante, sobre rubéola congénita (40, 83). En 1996 se evidenció una tasa de incidencia de SRC entre 0,4 y 4,3 por 1.000 nacidos vivos en países en desarrollo, a través de la vigilancia epidemiológica impulsada por la OMS. Esta incidencia es comparable, o incluso mayor en algunos casos, a la encontrada en países industrializados en la era prevacunal (146). Algunos de estos países han llevado a cabo campañas de vacunación masiva dirigidas a hombres y mujeres (Tabla 5) (129), para tratar de disminuir los casos de rubéola endémicos y la incidencia del SRC. Sin embargo, si no se alcanzan tasas de cobertura cercanas al 100% al final de la campaña, quedarán bolsas de población susceptible que plantean una amenaza constante para que ocurran casos de rubéola secundarios a importaciones (129).

Tabla 5. Eliminación de la rubéola en las Américas: Últimos países en realizar campañas de vacunación (129).

<i>País</i>	<i>Población objeto</i>	<i>Grupo de edad</i>	<i>Fecha</i>
Guatemala	7,8 millones Mujeres y hombres	8-39 años	septiembre 2006
República Dominicana	5 millones Mujeres y hombres	7-39 años	octubre 2006
Perú	19,8 millones Mujeres y hombres	2-39 años	octubre 2006
Argentina	7,4 millones mujeres Población cautiva de hombres Población de Alto Riesgo de hombres a determinar ^a	15-39 años	octubre 2006
México	20,3 millones Mujeres y hombres	17-29 años	febrero 2007
Venezuela	9,6 millones Mujeres y hombres	18-39 años	abril-mayo 2007
Haití	3,7 millones Mujeres y hombres	1-15 años ^a	Abril-mayo 2007

^a provisional

La rubéola y el sarampión reúnen los requisitos para ser enfermedades candidatas a la eliminación porque su reservorio es exclusivamente el ser humano, los viriones apenas sobreviven en el ambiente, existen técnicas diagnósticas suficientemente sensibles y específicas para detectar la infección y se dispone de vacunas efectivas y baratas para las que se ha demostrado inmunidad duradera (111). La eliminación de la rubéola es teóricamente más fácil de alcanzar que la eliminación del sarampión, dado que la rubéola es menos contagiosa por lo que el nivel de inmunidad poblacional necesario para interrumpir la transmisión (inmunidad de grupo) es menor que el necesario para eliminar el sarampión (111). Para lograr este objetivo, la OMS ha establecido una estrategia de control a nivel mundial en la que es pieza fundamental una vigilancia reforzada del SRC y de la rubéola basada en una definición de caso y algoritmos para la investigación de casos sospechosos (3). En 2004, esta organización estableció un sistema de genotipado y una nomenclatura para las cepas de RUBV salvajes a fin de

facilitar una vigilancia global de los patrones de circulación del virus (193), lo que ayudará a monitorizar la vía de transmisión e identificar la interrupción de la transmisión de virus endémicos (10, 193). A pesar de esto, la alta densidad de población, los intensos movimientos migratorios y el elevado tráfico internacional que caracterizan a muchas ciudades en el mundo, se traducen en un riesgo alto de importación del RUBV, que hace necesario lograr niveles de cobertura mayores a 95% para evitar casos secundarios a dichas importaciones (129). En el 2005, la Región Europea de la OMS se planteó añadir al objetivo de eliminación del sarampión y de la prevención de la infección de la rubéola congénita (IRC), la eliminación de la rubéola endémica para el año 2010. En septiembre del 2010, la Oficina Regional Europea de la OMS, retrasó la fecha del objetivo de la eliminación del sarampión y la rubéola al año 2015, dadas las dificultades de algunos países para la implementación del Plan y alcanzar los objetivos propuestos, a la vez que renovó su compromiso de trabajar para alcanzar estos objetivos (10, 111, 183). El Comité urgió a los estados miembros a:

- Revisar y reforzar su compromiso político y los recursos destinados a conseguir el objetivo de la eliminación del sarampión y la rubéola.
- Reforzar la vigilancia epidemiológica del sarampión y la rubéola con el objeto de monitorizar los indicadores para verificar que se alcanzan los objetivos de eliminación.
- Revisar los planes nacionales de eliminación particularmente en lo referente a la inmunización de poblaciones susceptibles.
- Establecer comités nacionales para la verificación de la eliminación del sarampión y de la rubéola que documenten los progresos hacia la eliminación y los notifiquen a una futura comisión regional de verificación.

El comité regional pidió además que se informara de los progresos hacia la eliminación del sarampión y de la rubéola en 2013.

Las estrategias para conseguir estos objetivos son alcanzar y mantener altas coberturas de vacunación en la población y reforzar la vigilancia epidemiológica. Las estrategias para alcanzar los objetivos de eliminación de

la circulación endémica del sarampión y de la rubéola en la Región Europea de la OMS son:

- a. Alcanzar y mantener coberturas de vacunación $\geq 95\%$ con 2 dosis de vacuna que contenga MeV y al menos con 1 dosis de vacuna que contenga RUBV de forma rutinaria, prestando especial atención a poblaciones de riesgo con bajas coberturas.
- b. Ofrecer una segunda oportunidad mediante recaptación de susceptibles a sarampión (colegios, universidades, empresas, personal sanitario).
- c. Ofrecer la vacuna de la rubéola a personas susceptibles (mujeres en edad fértil, niños y adolescentes).
- d. Implementar una vigilancia de calidad frente a sarampión, rubéola y SRC basada en cada caso, investigando de forma rigurosa cada caso sospechoso con confirmación de laboratorio.
- e. Mejorar la difusión de información a los profesionales sanitarios y al público en general (6, 111, 185).

Desde la aprobación de la vacuna de rubéola de virus vivo atenuado en 1969, se han obtenido grandes progresos en Norteamérica y en muchos países de Europa donde la vacunación universal ha sido utilizada durante mucho tiempo, logrando que se hayan controlado bien la rubéola y el SRC (10, 40, 204). La vacuna que contiene rubéola redujo un 99% los casos en EEUU, desde los 70.000 de 1969 hasta los 220 de 1988. Tras los 20.000 niños nacidos con SRC después de la epidemia de 1964 en EEUU, el número de casos informados de SRC en los últimos 30 años desde la introducción de la vacuna, ha sido menor de 1.000 (40). Los datos específicos obtenidos por los sistemas de vigilancia han documentado la eliminación de la rubéola endémica en Canadá y EEUU (91, 143). La eliminación de la rubéola se define como la interrupción sostenida de la transmisión endémica del virus dentro de una región geográfica durante más de 12 meses y la ausencia de casos de SRC atribuidos a la transmisión endémica (129, 187). La transmisión endémica se define como la existencia de transmisión continua

de un virus de la rubéola autóctono o importado que persiste durante un período de doce meses o más en una determinada área geográfica (185).

La mayoría de los 504.990 casos de rubéola publicados entre 2000 y 2007 en Europa, provenían de Polonia y Rumania, con un 47% y 40%, respectivamente (Tabla 6) (62). La distribución de edad fue de 21.374 casos (4%) entre niños menores de 1 año, 68.360 (14%) entre 1 y 4 años, 171.048 (34%) entre 5 y 9 años, 148.234 (29%) entre 10 y 14 años, 64.819 (13%) entre 15 y 19 años, y 28.181 (6%) entre \geq a 20 años de edad (62). El estatus de vacunación solo se conoció en un 15% (77.795) de todos los casos publicados (Tabla 6). De estos, 67.566 (87%) eran no vacunados, 6.338 (8%) estaban vacunados con una dosis, 1.367 (2%) por lo menos con dos dosis, y 2.524 (3%) estaban vacunados con un número desconocido de dosis (Tabla 6) (62). El descenso de la incidencia total de casos en Europa en este periodo (2000-07) se atribuye al descenso marcado en las tasas de incidencia de unos pocos países, siendo el mayor descenso el reportado por Rumania (62).

Tabla 6. Número de casos de rubéola informados y porcentaje confirmado por laboratorio desde 2000 a 2007 en Europa (62).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Total	Confirmado por Laboratorio
Bulgaria	28.448	1.655	806	254	474	1968	247	88	33.940	1%
Croacia	0	3	11	2	2	2	2	33	55	64%
Chipre	0	1	0	0	6	0	0	0	7	0%
República Checa	743	894	3.156	28	31	8	8	4	4.872	64%
Estonia	370	274	96	48	22	6	5	10	831	6%
Finlandia	0	0	3	0	0	0	1	0	4	100
Grecia	12	14	14	5	2	16	1	0	64	0%
Hungría	107	65	42	47	36	32	22	0	351	3%
Islandia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Irlanda	97	57	33	59	49	17	14	19	345	3%
Italia	2.605	5.151	6.224	1.615	461	297	257	758	17.360	0%
Letonia	62	358	2.578	310	52	35	12	7	3.414	14%
Lituania	1.302	458	277	170	93	118	110	13	2.541	0%
Malta	6	0	2	4	0	6	1	2	21	19%
Noruega	4	0	1	1	2	1	2	0	11	100%
Polonia	46.181	84.419	40.518	10.588	4.857	7.946	20.668	22.891	238.068	0,1%
Portugal	58	40	29	14	8	3	9	6	167	5%
Rumania	5.125	5.076	10.790	119.259	47.364	6.801	3.553	2.958	200.926	0%
Eslovaquia	11	2	7	1	3	1	2	2	29	24%
Eslovenia	9	8	3	9	1	0	1	1	32	6%
España	345	179	138	113	87	593	89	60	1.604	39%

Suecia	1	3	1	0	0	0	2	2	9	89%
Reino Unido	72	49	78	18	16	39	34	33	339	99%
Total	85.550	98.706	64.807	132.545	53.566	17.889	25.040	26.887	504.990	1%

Con respecto a la vacunación frente al RUBV en Europa, en el año 2009, los 53 países de la Región Europea de la OMS ya usaban una vacuna que contenía RUBV frente a los 51 que lo hacía en el 2006 y a los 39 que lo hacían en el año 2001 (190, 191, 204). Aún así, la incidencia de rubéola sigue siendo alta en la Región Europea. Así, durante el período 2005-2009 se informaron 68 casos de SRC, 33 (48,5%) casos en los países miembros de los Nuevos Estados Independientes que formaban la Unión Soviética (NEI) y 26 (38,2%) de ellos en un solo país, la Federación Rusa (204). Asimismo, hubo un decrecimiento del 94% en el número total anual de casos de rubéola en la Región de Europa, desde 206.359 (Incidencia anual-IR, 233 casos/1.000.000 personas) en el 2005 a 11.623 (IR, 13 casos/1.000.000 personas) en el 2009 (204). De las tres subregiones Europeas, Occidental (EO), Central (EEC) y Oriental (NEI), y la proporción más grande de casos publicados durante 2005-2008 fue la de los países miembros de la NEI (45-90%), seguido por EEC (9-41%) y EO (1-14%). En 1999, EEC publicó la mayor proporción de casos, un 74% (204). De los casos publicados por los países miembros de la NEI hubo un decrecimiento del 99%, desde 185.516 en 2005 a 2.498 en 2009. De todos los casos publicados por los países miembros de EEC hubo un incremento desde 19.390 en 2005 a 26.735 en 2007 y luego, un descenso a 8.645 en 2009. Polonia y Rumania reportaron las tasas de incidencia más altas durante 2006-2008 entre los países miembros de EEC (62, 204). En el 2009, Polonia publicó la incidencia de casos más alta, seguida por Bosnia y Herzegovina. Los casos publicados en los países miembros de EO fluctuaron entre 1.453 en 2005 y 480 casos en 2009, excepto en 2008, en el que los 5.075 casos reportados fueron atribuidos al mismo brote en Italia (204). La mayoría de los casos de rubéola publicados en la Región Europea de la OMS han ocurrido en individuos no vacunados y hay muchos entre individuos mayores o iguales a 20 años de edad (10).

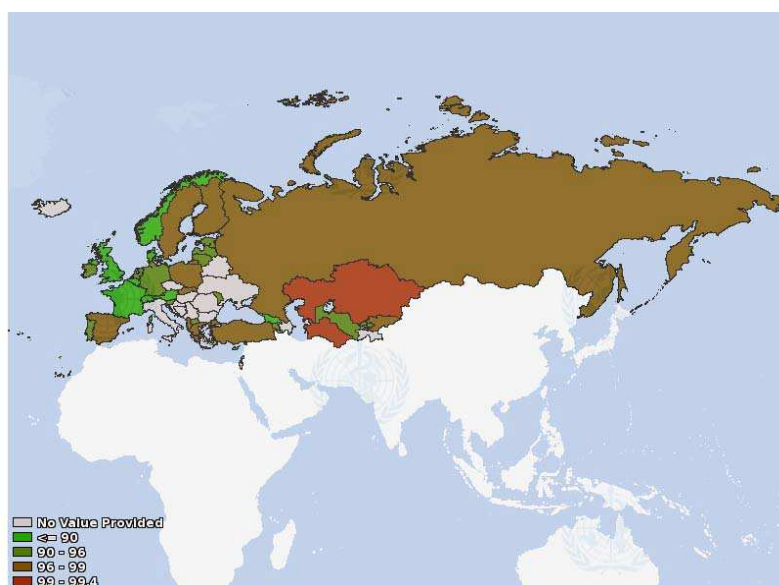


Figura 10. Cobertura de la vacuna de rubéola en la Región Europea de la OMS, 2009 (111).

Fuente: <http://data.euro.who.int/cisid/?TabID=246176>.

En España se elaboró y aprobó el “Protocolo de Vigilancia de la Rubéola y del SRC en la Fase de Eliminación” en el año 2008 (112), semejante al que lleva vigente para sarampión desde el año 2001, como parte de la estrategia de eliminación de la rubéola en Europa, definida por la OMS. La confirmación por laboratorio de todos los casos sospechosos, es una herramienta fundamental definida en dicho plan, al igual que el conocimiento del genotipo implicado en todos los brotes y casos esporádicos.

Los análisis de laboratorio correspondientes a este plan son ejecutados por una Red de laboratorios coordinados por un Laboratorio Nacional de Referencia, que es el CNM. Sin embargo, antes del 2008, ni el CNM ni ninguno de los laboratorios de la red, disponían de metodología para el genotipado del RUBV.

Desde la introducción de los programas de vacunación, la cobertura media nacional de vacunación con la primera dosis de TV fue aumentando lentamente, siendo desde 1999 superior al 95% a nivel nacional y superior al 90% en todas las comunidades autónomas (111). En el período 2004-2008 la cobertura nacional con la segunda dosis superó el 95%. Sin embargo, en 2010 se observa un descenso, con una cobertura nacional con la primera

dosis del 95,2% [89,4-100%], mientras que para la segunda dosis fue del 92,3% [77,6-97,7%], con once comunidades que han registrado una cobertura inferior al 95% (Tabla 6 y Figura 11) (111).

A partir de la introducción de los programas de vacunación, el descenso de la incidencia de rubéola en España ha sido progresivo, siendo lo más drástico a partir del año 1997, pasando de 3.828 casos (9,73 casos/100.000 habitantes) a menos de 884 casos desde 1998 (2,25 casos/100.000 habitantes), y a solo 9 casos confirmados en el año 2010 (0,03 casos/100.000 habitantes) (Figura 11 y Tabla 7) (111). Las tasas de incidencia de los últimos años tienen una tendencia decreciente, lo que indica una escasa circulación viral en España, con algunos brotes de pequeño tamaño localizados en algunas Comunidades Autónomas (CCAA), que han afectado principalmente a adultos jóvenes en población inmigrante de ambos sexos y varones adultos no cubiertos en los programas de vacunación, los cuales hicieron que la tasa del año 2005 sobrepasara 1 caso/100.000 habitantes, concretamente 1,34 casos/100.000, aunque la mayoría de ellos se debieron a un solo brote en Madrid. En 2006 la incidencia fue de 0,86 casos/100.000, la más alta desde la implantación del plan de eliminación del sarampión (112). Durante el año 2007 todas las CCAA, excepto Ceuta (1,34) y las Islas Canarias (1,14), presentaron tasas inferiores a 1/100.000 (112). Durante el año 2010 se notificaron 16 casos sospechosos de rubéola: 9 casos confirmados y 7 descartados (111). Respecto al SRC, entre enero 1997 y diciembre 2007, se han publicado un total de 13 casos de SRC, el año 2005 con 5 casos (4 de ellos relacionados con el brote de Madrid) fue el que más casos presentó. No se detectó ningún caso desde el año 2005 hasta el 2007. Un total de 8 casos fueron notificaciones y 5 fueron resultado de la búsqueda activa hospitalaria (29). Se pudo averiguar la nacionalidad de las madres en un total de 9 casos, siendo 3 nacidas en España y 6 inmigrantes (2 de África, 3 de Latinoamérica y 1 de Filipinas) (29). La incidencia media anual es <1 caso por 100.000 nacidos vivos, excepto en el año 2005 que fue de 1,34 por 100.000 nacidos vivos (único año en que no se cumplió el objetivo marcado por la Región Europea de la OMS) (Tabla 7) (112).

Tabla 7. Incidencia de rubéola declarada. España 1982-2012. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

<i>AÑO</i>	<i>NÚMERO DE CASOS</i>	<i>TASA/100.000</i>
1982	74.803	197,01
1983	161.142	423,91
1984	150.530	392,75
1985	144.288	375,02
1986	3.717	191,97
1987	32.897	84,97
1988	18.248	47,02
1989	21.220	54,57
1990	23.460	60,22
1991	32.570	83,48
1992	14.134	36,95
1993	8.539	21,82
1994	6.379	15,77
1995	4.721	12,03
1996	16.688	42,40
1997	3.828	9,23
1998	884	2,25
1999	533	1,35
2000	345	0,85
2001	179	0,45
2002	138	0,35
2003	113	0,29
2004	87	0,20
2005	592	1,34
2006	89	0,20
2007	65	0,15
2008	65	0,15
2009	30	0,09
2010	9	0,03
2011	11	0,03
2012	50	0,10

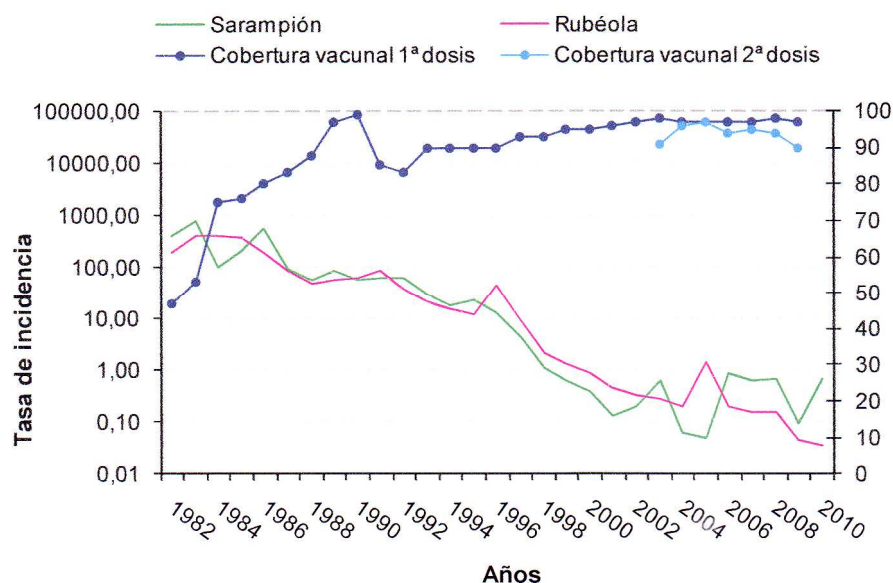


Figura 11: Incidencia de sarampión y rubéola y cobertura de vacunación con TV. España 1982-2010 (111).

En consecuencia con todo lo dicho en este apartado, la consecución del objetivo de eliminación de la rubéola para el año 2015 en España parece bien encaminada, aunque la disminución de las coberturas vacunales observada en el último año resulta preocupante. De hecho, la tendencia decreciente de incidencia se estabilizó en 2011 (nueve casos declarados) y está aumentando en 2012, con 37 casos acumulados solo hasta la semana 18. En el contexto europeo parece algo más complicado de alcanzar de lo que se preveía hace unos años (133). Por otra parte, esta baja incidencia que se deduce del número de casos declarado, no viene apoyada en unos indicadores de intensidad de vigilancia adecuados en el contexto del Plan Nacional de Eliminación. Así, en el año 2011 tan solo se notificaron y estudiaron 30 casos sospechosos a nivel nacional y 87 en 2012, cifras muy lejos de las recomendaciones de al menos un caso sospechoso por cien mil habitantes estudiado para garantizar una intensidad de vigilancia adecuada.

3. OTROS VIRUS PRODUCTORES DE EXANTEMA

3.1 Virus del sarampión.

El MeV es un miembro del género *Morbillivirus* en la subfamilia *Paramyxovirinae* de la familia *Paramyxoviridae*, orden Mononegavirales (156). Los viriones son altamente pleomórficos con un tamaño entre 100-300 nm de diámetro, y consisten en una envoltura viral que está constituida por una bicapa lipídica de origen celular, con dos glicoproteínas transmembranales de tipo I que tienen una longitud entre 9 a 15 nm, que se proyectan desde la superficie de la envoltura, las cuales son: la glicoproteína de la Hemaglutinina (H: 80 KDa) y la glicoproteína de Fusión [F: que solamente se activa después de que se procesa una proteína precursora de 60 KDa por proteasas celulares, para producir un heterodímero F1 (40 KDa) y F2 (22 KDa)]. Además, la proteína de la Matriz (M) está insertada en la envoltura viral, la cual sirve para fijar la ribonucleoproteína (RNP) a esta. La envoltura viral rodea a un complejo de RNP que está compuesto por el ARN genómico viral y la Nucleoproteína viral (N). El ARN genómico viral es monocatenario de 15.894 nucleótidos, no segmentado, de polaridad negativa y está encapsidado completamente en una nucleocápside de simetría helicoidal formada por él mismo, la proteína N y el complejo de la polimerasa viral, el cual está constituido por las proteínas L (polimerasa de ARN específica de la RNP) y P (Fosfoproteína) (75, 156).

El rango de huéspedes naturales de MeV se restringe solo a humanos. Experimentalmente, únicamente los monos y las ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*) pueden ser infectados intranasalmente de manera adecuada. *In vitro* se puede replicar en una variedad de células, como por ejemplo, células primarias de riñón embrionario humano (HEK), células linfoides humanas transformadas por el EBV (B95) o líneas celulares continuas derivadas de células de riñón de mono verde africano (Vero, CV-1 o Vero/hSLAM, utilizada en la actualidad) (75, 156, 189).

La infección se adquiere vía inhalación de aerosol, a través del tracto respiratorio superior o con menos frecuencia por la conjuntiva, donde el

virus se replica inicialmente. Posteriormente pasa a ganglios linfáticos regionales y a torrente sanguíneo, para producir la viremia. Las células diana del virus son linfoides, lo que conduce a una pronunciada leucopenia (156) e inmunodepresión transitoria. Después de un período de incubación de 8 a 12 días, el virus se detecta en suero (primera viremia) y comienza la secreción en nasofaringe, la cual puede continuar hasta 4 días después. La fase virémica puede venir marcada por síntomas prodrómicos leves y malestar. El exantema maculopapular comienza aproximadamente 14 días después de la exposición al virus y coincide con la aparición de anticuerpos, mientras que los síntomas prodrómicos empiezan a disminuir. La presencia de virus en suero cesa poco después de la aparición del exantema, sin embargo, en secreciones nasofaríngeas y orina se puede detectar el virus durante una semana o más después de que el exantema desaparezca.

3.1.1 Manifestaciones clínicas.

El sarampión típico se adquiere a través de aerosoles y tiene un período de incubación de 8 a 12 días. El período prodrómico consiste de fiebre alta (39-40,5°), malestar, estornudos, tos, coriza y conjuntivitis, y puede durar entre 2 a 4 días. Al inicio del estado prodrómico, aparece un exantema transitorio en la mucosa bucal y velo del paladar formado por unas manchas pequeñas con centro blanco o blanco azulado sobre una base eritematosa, son las manchas de Koplik, patognomónicas de la enfermedad, que persisten durante 2 ó 3 días y desaparecen antes de la aparición del exantema típico. El período prodrómico acaba cuando aparece el exantema maculopapular típico, el cual empieza en la cara y nuca, y luego se disemina en forma progresiva al tórax, tronco y extremidades. El exantema aparece como maculopápulas discretas de color rosa que se fusionan para formar manchas, que después cambian a color marrón. El exantema desaparece resolviéndose con una ligera descamación que se hace muy evidente en niños desnutridos. La fiebre persiste 2 ó 3 días después del comienzo del exantema y la tos puede persistir otros 10 días. Puede producirse fotofobia, dolor de cabeza, dolor abdominal, linfadenopatía y esplenomegalia moderada. La enfermedad es transmisible desde tres días antes hasta 4 días

después de la aparición del exantema y la recuperación, cuando la enfermedad no se complica, comienza poco después de la aparición del exantema (75, 135).

El MeV presenta afectación multiorgánica e infecta a células epiteliales, reticuloendoteliales y leucocitos, incluyendo monocitos, macrófagos y linfocitos T. La infección provoca disminución de linfocitos CD4 desde el comienzo del exantema hasta un mes después (135), produciendo un cuadro de supresión inmune temporal.

Las complicaciones del sarampión agudo son relativamente raras y resultan principalmente de infecciones secundarias oportunistas. Entre las complicaciones respiratorias más comunes debido a infecciones por el mismo virus o por infecciones secundarias debido a bacterias u otros virus se incluyen: neumonía, bronconeumonía, bronquitis y otitis media. La neumonía bacteriana secundaria es la complicación más común y es la que está más asociada a las muertes por sarampión. Es más probable que la neumonía sea más grave clínicamente durante el embarazo. En individuos con compromiso del sistema inmune o en niños con deficiencia en su nutrición se puede producir neumonía de células gigantes, causada por el propio virus (75, 135).

La complicación más peligrosa del sarampión clásico, es la encefalomiелitis postinfecciosa, la cual ocurre en 1-3/1.000 casos de sarampión, y es fatal en cerca del 25% de pacientes, dejando secuelas neurológicas en un 33% de supervivientes, incluyendo discapacidad intelectual grave, alteraciones motrices, ceguera y hemiparesia (135, 156). La proporción de afectados es mayor en adolescentes y adultos que en niños en edad escolar. Esta afectación neurológica parece ser causada por una respuesta inmune anormal que afecta a la proteína mielínica básica (135).

La panencefalitis esclerosante subaguda (PEES) es una complicación muy rara y fatal, causada por la persistencia del virus en el tejido del sistema nervioso central durante varios años, seguido de una infección lenta progresiva y desmielinizante que afecta a múltiples áreas del cerebro. Ocurre con una frecuencia de 1 en 300.000 a 1 en 1.000.000 de individuos, con un período de incubación entre 5-15 años, después de que la infección aguda se

haya presentado a una edad muy temprana (135). Por razones desconocidas, los niños son más propensos a desarrollar PEES que las niñas (156). Los anticuerpos frente a MeV están presentes en LCR y suero. La enfermedad progresa lentamente con degeneración cerebral progresiva la cual conduce a la persona a un estado vegetal o coma e, irreversiblemente, a la muerte. Los pacientes fallecen entre varios meses y años después del comienzo de la enfermedad. Se ha encontrado el MeV salvaje, pero no el vacunal, en tejido cerebral (135).

La encefalitis con cuerpos de inclusión es una infección progresiva del sistema nervioso central que afecta a personas inmunocomprometidas, sea con infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o con leucemia. Comienza normalmente de 5 semanas a 6 meses después de la infección aguda. Se inicia con cambios del estado mental y convulsiones en ausencia de fiebre. Más de un 80% de afectados fallecen en pocas semanas (135).

Además, se ha observado infección por MeV en el tracto intestinal después de analizar biopsias gástricas antes de la presencia del exantema característico y, también, en tejidos de apéndice antes y durante la presencia del exantema, encontrándose células gigantes típicas. Se han observado complicaciones como diarrea asociadas al MeV, con tasas altas entre niños menores de 5 y personas mayores de 30 años, la cual comienza típicamente justo antes del inicio del exantema, sugiriendo que el virus es responsable de la mayoría de los episodios. Aunque las infecciones secundarias por bacterias u otros virus pueden contribuir a la severidad y duración de la enfermedad (135).

3.1.2 Epidemiología y control.

El sarampión es endémico en muchos países, pero predominantemente en países en desarrollo. La OMS estima que en 2008 causó 164.000 muertes. El sarampión es muy contagioso, hay un solo serotipo, no existen reservorios animales, las infecciones subclínicas son raras y la infección confiere inmunidad de por vida. En general, la mortalidad del sarampión es mayor entre niños menores de 2 años y en personas adultas.

La transmisión del MeV es principalmente por vía respiratoria. La diseminación tan eficiente de este virus es mediada por aerosoles y por secreciones respiratorias, las cuales pueden permanecer infecciosas por varias horas, por lo que no se necesita el contacto directo para producir una infección. Para que la transmisión del MeV sea sostenible y persista en una comunidad, se requiere una población mínima de 500.000 individuos susceptibles; en comunidades menores, el virus desaparece hasta que es introducido nuevamente desde el exterior, si se acumula un número crítico de personas susceptibles o no vacunadas.

En 1998, la Asamblea Mundial de la Salud estableció el objetivo de la eliminación del sarampión indígena de la Región Europea en 2007, para poder certificar su eliminación antes de 2010 (150). Desde el 2005, la OMS y la UNICEF, formularon planes para el año 2010 de reducir en un 90% la tasa bruta de mortalidad entre los niños de todo el mundo a través de los programas de vacunación. Si bien los datos exactos están aún pendientes, varios informes indican que este objetivo en gran medida se ha logrado en algunas regiones de la OMS en el mundo, como Europa y las Américas. A esta última región, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) la declaró libre de sarampión endémico en el 2002. El progreso en el control del sarampión global ha sido resultado de una campaña de inmunización de la población muy alta en muchas regiones del mundo. Consecuentemente, se ha publicado una reducción de la mortalidad por el sarampión del 78%, desde 733.000 muertes estimadas en el 2000 a 164.000 muertes en 2008 (112), con permanencia de altas tasas de mortalidad en África y el sudeste de Asia, los cuales contribuyen con el 85% de todas las muertes publicadas por MeV (14).

Cuando las coberturas vacunales en la población infantil son elevadas, el rango de edad de los infectados tiende a incrementarse. Sin embargo, la incidencia específica por edad decrece en todos los grupos etarios debido a que la inmunidad general reduce la transmisión e indirectamente los protege a todos (192). Para lograr el objetivo de la eliminación del sarampión, la OMS ha planificado una estrategia mundial adaptada a las características de cada una de las regiones, pero basada en la obtención de altas tasas de

vacunación y un adecuado sistema de vigilancia epidemiológica y virológica. Para facilitar la vigilancia virológica, la OMS ha establecido una definición clínica de caso, ha determinado unos criterios de confirmación por laboratorio y ha estandarizado la nomenclatura y los procedimientos de laboratorio para describir las características genéticas de las cepas de MeV salvaje (188). Hasta el momento, la OMS ha reconocido 24 genotipos de cepas de sarampión salvaje (A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, E, F, G1, G2, G3, H1, H2), donde 5 (B1, D1, E, F y G1) están actualmente inactivos (188). Aunque se han hecho grandes progresos hacia la eliminación del sarampión en la región europea de la OMS, en los dos últimos años se ha experimentado un aumento muy significativo de la incidencia y se ha tenido que retrasar la fecha para el objetivo de la eliminación del sarampión de 2010 a 2015. Solo en el 2010, se publicaron 30.367 casos de sarampión en la región, cuatro veces lo reportado en el 2009. La mayoría de los casos reportados en 2010 (28.672; 94%) fueron de cuatro países: Bulgaria (22.005, incluyendo 24 muertes; 294,5/100.000 habitantes), Francia (5.021, incluyendo dos muertes; 8,9/100.000 habitantes), Italia (861) y Alemania (787). En este año, hubo brotes en casi todos los países, pero en nueve no se publicaron casos. El brote de Bulgaria, que se inició en marzo de 2009 después de la importación desde Alemania, fue la principal causa del alto incremento publicado en el 2010. El 85% de los casos son no vacunados (61, 111). En el año 2011 la tendencia ha empeorado aún más con un total de 35.768 casos, la mayoría merced a un brote en Francia, aunque decreció en 2012 con 23.871 casos, lo cual podemos seguir considerando como una incidencia alta considerando el objetivo de eliminación fijado para 2015.

En España, antes de la introducción de la vacuna del sarampión, la incidencia acumulada anual media era de 429 por 100.000 habitantes (150.000 casos por año) con una tendencia estable, ciclos bianuales y un patrón estacional primaveral. La prevención de sarampión en España mediante vacunación se realiza desde 1978, aunque posteriormente en 1981 se introdujo la TV en el calendario general. En 1995 se introdujo la segunda dosis a los 11 años de edad y en 1999, se adelantó a 3 a 6 años. Según el

calendario recomendado por el Ministerio de Sanidad para el 2012, se deben administrar dos dosis de TV: la primera entre los 12 y los 15 meses de edad, con preferencia a los 12 meses y la segunda antes de la escolarización obligatoria entre los 3 y 6 años, con preferencia a los 3 años. Gracias a estas pautas se ha observado un descenso continuado en el nivel medio de la incidencia desde 1987, hasta los niveles alcanzados en 1999 con 244 casos notificados (0,62 por 100.000 habitantes) (14, 111). La incidencia de casos sospechosos de sarampión durante el año 2010 fue de 0,86 por 100.000 habitantes (Tabla 8), con un ligero aumento con respecto al 2009, debido a los 392 casos sospechosos ocurridos este año (61, 111). Sin embargo, en 2011 la situación ha empeorado drásticamente con 3.512 casos (7,4 por 100.000 habitantes) y brotes a nivel nacional.

Tabla 8. Casos de sarampión en España, 2010-2012.

	<i>Laboratorio</i>	<i>Confirmado Vínculo</i>	<i>Compatible</i>	<i>Descartados</i>	<i>Total Sospechoso</i>	<i>Incidencia 100.000</i>	<i>Incidencia Sospechosos 100.000</i>
2010	246	35	21	90	392	0,66	0,86
2011	2152	489	877	290	3808	7,62	8,24
2012	813	243	148	376	1580	2,61	3,43

3.1.3 Diagnóstico.

El sarampión clásico se diagnostica clínicamente con bastante precisión. A efectos de vigilancia epidemiológica, la OMS ha establecido la definición de caso clínico como enfermedad caracterizada por exantema maculopapular generalizado de tres o más días, fiebre de más de 38°C y uno de los siguientes síntomas: tos, coriza o conjuntivitis.

La confirmación de una respuesta inmune reciente a través de la detección de IgM específica para el diagnóstico de laboratorio del sarampión, es la estrategia de preferencia. Sin embargo, la detección directa del virus en exudado faríngeo y orina mediante el aislamiento viral la complementa, aunque, dado que es difícil y lenta, se tiende a sustituir por técnicas de amplificación genómica, que también permiten la genotipificación por secuenciación genómica. Además, la OMS recomienda obtener las cepas del

virus de casos representativos y brotes, para futuros estudios biológicos, epidemiológicos y moleculares más detallados (193). Según recomendaciones de la OMS, es necesario establecer el diagnóstico diferencial con otros virus productores de exantema como son: RUBV, B19V, exantema súbito, eritema infeccioso y exantema asociado a infecciones por algunos EV o AdV (75, 139). Además, en áreas endémicas el diagnóstico diferencial se debe establecer también con DENV, Sindbis, Chikungunya y Ross River (170).

Las muestras clínicas más adecuadas para el aislamiento viral en cultivo celular son: exudado faríngeo o lavado nasofaríngeo tomadas 2-3 días antes de aparecer el exantema, hasta 5-7 días post-exantema y la muestra de orina, en la cual la excreción de virus es más larga, pudiendo recuperarse hasta 15 días después del exantema. Sin embargo, también pueden utilizarse las muestras de sangre, obtenidas 2-3 días antes de aparecer el exantema, hasta 1-2 días post-exantema (121, 145). Se han utilizado diversas líneas celulares para el aislamiento del MeV, al inicio del Plan de Eliminación la línea celular utilizada para el aislamiento del MeV era la B95a, que es una línea transformada con el EBV, haciendo difícil su transporte por considerarse infecciosa, pero en la actualidad, se utiliza la línea celular Vero/hSLAM que es tan sensible como la B95 y además se puede usar para aislar RUBV (189).

La confirmación serológica de la infección de sarampión depende de la demostración de IgM específica frente al virus en una sola muestra de suero, aunque si ésta está tomada de forma muy temprana, puede ocurrir que sea negativa, requiriendo la toma de una segunda muestra para evidenciar seroconversión. Sin embargo, la detección de genomas en hisopado faríngeo, orina y suero dentro de los dos primeros días de inicio de síntomas, suele permitir el diagnóstico en estos momentos tempranos (60, 124). Desde el 2008, la OMS ha recomendado el uso de muestras de saliva o de sangre seca en papel de filtro, para el diagnóstico serológico y la detección de ARN víricos por PCR del MeV en situaciones en las que hay dificultades para realizar punción venosa, ya que permite realizar un diagnóstico con un rendimiento adecuado (45, 151, 187).

3.2 Parvovirus B19.

La familia *Parvoviridae* incluye un grupo de virus de pequeño tamaño, monocatenarios que infectan un amplio rango de animales, causando enfermedades severas en muchos de ellos (16). Esta familia consta de dos subfamilias, *Parvovirinae*, que está constituida por virus que infectan vertebrados y *Densovirinae*, que está constituida por virus que infectan invertebrados. La subfamilia *Parvovirinae* incluye al género *Erythrovirus* al que pertenece el B19V (7, 119). Los *Erythrovirus* son virus pequeños de entre 20 a 26 nm de diámetro, sin envoltura, con una cápsida de simetría icosaédrica formada por dos proteínas, VP1 y mayoritariamente VP2, que encapsidan una cantidad igual de cadenas de ADN linear monocatenario de sentido negativo y de sentido positivo, de 5,6 kb (5.596 nt) (16, 20).

El B19V se replica y destruye células progenitoras eritroides (25, 157, 164), las cuales se encuentran en la médula ósea, hígado fetal, cordón umbilical y sangre periférica (25, 164). Al no disponer de polimerasa vírica se replican únicamente en células en división (119).

La infección por B19V suele producirse durante la niñez. La principal ruta de transmisión es el tracto respiratorio a través de aerosoles, aunque también se excreta por orina. La infección también puede darse por transplante de órganos o médula ósea y especialmente por transfusión de componentes sanguíneos, en particular por células rojas (38, 114, 157, 162). Otra ruta de transmisión es la transplacentaria, de la madre al feto. Cerca del 30% de las infecciones primarias maternas conducen a infecciones en el feto, lo que produce frecuentemente pérdida fetal. La viremia se acompaña de síntomas prodrómicos leves, no específicos, y la destrucción de eritroblastos en médula ósea, produciéndose una depleción de glóbulos rojos circulantes que suele ser asintomática, excepto en pacientes con problemas pre-existentes de anemia. La aparición de IgM e IgG específicas a los 10 a 14 días de la infección se acompaña de los síntomas clásicos del exantema eritematoso principalmente en niños e inflamación de las articulaciones principalmente en adultos, que coinciden con la formación de inmunocomplejos circulantes que juegan un papel importante en el

desarrollo de la enfermedad (20). La IgM persiste por 3 a 8 semanas y la IgG para toda la vida (157).

3.2.1 Manifestaciones clínicas.

Eritema infeccioso y artropatía. El eritema infeccioso es la manifestación más común de la infección por B19V, denominada también quinta enfermedad (81). Este trastorno eritematoso es más común en niños que empiezan la escuela y preescolares, pero ocasionalmente se presenta también en adultos. En torno a un 25% de infecciones por B19V son asintomáticas. Los síntomas aparecen como un eritema que tiene un aspecto típico de “bofetada en la mejilla” y una erupción maculopapular reticulada en extremidades y tronco (20, 159). Esta última manifestación, se puede confundir con otros exantemas infantiles como la rubéola (20).

Al igual que la rubéola, la infección por el B19V esta asociada a artritis y artralgia, más común en adulto, pero también presente en niños (37). Aproximadamente un 50% de casos de eritema infeccioso en adultos se asocian con manifestaciones articulares que persisten durante 1 mes, con preferencia en manos, muñecas, rodillas y tobillos (37). Se ha propuesto que, de manera similar al exantema, estos síntomas están asociados con inmunocomplejos circulantes que se presentan después del desarrollo de los anticuerpos específicos contra el B19V. Además, se ha propuesto al B19V como el agente causante de artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil y poliartritis erosiva, ya que se ha detectado infección reciente por B19V y altos niveles de anticuerpos frente al mismo en muchos de estos pacientes (37), aunque esta relación causal es controvertida ya que, además, se ha encontrado ADN del virus en membrana o tejido sinovial de individuos seronegativos (32, 36, 37, 162). Asimismo, se conoce la presencia frecuente de genoma del B19V en órganos de individuos fallecidos por causas no relacionadas (125).

El hallazgo reciente de ADN del B19V en un 64% de biopsias de piel en un grupo control, comparado con el 50% encontrado en pacientes con urticaria confirma que no se pueden obtener conclusiones precipitadas sobre la

implicación de este virus en distintos desórdenes cutáneos y posiblemente en otros desórdenes clínicos asociados a infecciones por el B19V (37).

Después de la infección por B19V, natural o experimental, se producen inmunoglobulinas tipo M y G, que son las que neutralizan los virus circulantes para controlar la infección en personas inmunocompetentes (157). También se pueden detectar anticuerpos IgA, que presumiblemente juegan un papel en la protección contra la infección vía nasofaringe (20, 21).

Anemia aplásica transitoria y desórdenes hematológicos. La infección aguda por B19V es la causa de la crisis aplásica transitoria en pacientes con desórdenes hematológicos subyacentes semejantes a anemia falciforme, talasemia o esferocitosis hereditaria, produciendo una anemia severa debido al descenso abrupto de la hemoglobina asociada siempre a la desaparición total de los precursores eritroides de la médula y por una reticulocitopenia, debido a una viremia masiva. Generalmente no se produce exantema. La recuperación es espontánea debido a que es una situación autolimitada, sin embargo, el paciente puede presentar enfermedad aguda con síntomas de anemia grave o letal. La crisis usualmente finaliza con la aparición de anticuerpos antivíricos específicos entre 7-10 días después del comienzo (20).

Infección fetal e hidropesía fetal no inmune. La infección materna por el B19V significa un riesgo grave para el feto, que puede conducir a hidropesía fetal y a la pérdida fetal en la embarazada. La muerte fetal ocurre con mayor frecuencia cuando la madre se infecta en el primer trimestre de la gestación. La infección en el segundo trimestre se asocia predominantemente a hidropesía fetal. La infección en el tercer trimestre solo supone riesgo para el feto de forma muy excepcional. La hidropesía fetal se caracteriza por un edema generalizado, el cual se presume que se debe a la anemia severa y a la insuficiencia cardíaca congestiva en el feto. Es conveniente destacar que no todos los casos de hidropesía conducen a la pérdida fetal. La hidropesía fetal no inmune es una enfermedad rara que ocurre en 1/3.000 casos de infecciones primarias maternas por el B19V comprobadas (81). Cuando el

embarazo llega a término, no se observan secuelas en el neonato, excepto algunos casos excepcionales de anemia crónica persistente (20).

Infección persistente. Las infecciones persistentes se pueden observar en pacientes inmunodeprimidos los cuales no pueden producir anticuerpos neutralizantes y aclarar el virus, convirtiéndose en portadores crónicos con o sin anemia. En general, la presencia de genoma vírico en el torrente sanguíneo suele dejar de detectarse si se produce una mejoría en la condición inmunológica del paciente. La infección persistente se ha asociado con una amplia variedad de desórdenes inmunes adquiridos y congénitos (81). Sin embargo, y como ya se ha indicado anteriormente, la presencia de genoma de B19V en diversos tejidos, médula ósea y membrana o tejido sinovial de individuos sanos, parece un hecho frecuente (37, 125, 157).

3.2.2 Epidemiología.

La infección por B19V es común y tiene una distribución mundial. Esta infección puede ocurrir todo el año, pero es más común en climas templados desde final del invierno hasta principio del verano, y como brotes o casos esporádicos. La seroprevalencia aumenta con la edad, de 2 a 10% en niños menores de 5 años, de 40 a 60% en adultos de 20 años o más y más de 85% en la población geriátrica (81, 157). Se producen epidemias de eritema infeccioso con casos de crisis aplásica transitoria al mismo tiempo, con ciclos periódicos de 3-4 años (37, 81, 157).

La infección se transmite vía respiratoria a través de aerosoles o secreciones respiratorias, a través de sangre y sus derivados administrados de forma parenteral y, verticalmente, de la madre al feto (37, 81, 102). Se ha detectado ADN específico de B19V en secreciones respiratorias en el momento de la viremia, lo que sugiere que la diseminación del virus en la comunidad es vía respiratoria.

3.2.3 Diagnóstico.

El diagnóstico clínico requiere de diagnóstico de laboratorio, que suele basarse en la detección de IgM específica. La detección de genoma por PCR

mejora la sensibilidad, especialmente en casos de infecciones persistentes (37). Existe un patrón internacional de ADN del B19V que permite expresar resultados cuantitativos en unidades (37, 149). Se conocen tres genotipos diferentes de B19V. El genotipo 1 que incluye el prototipo B19V, es, con mucha diferencia, el más frecuentemente detectado y cosmopolita. El genotipo 2, que incluye la cepa LaLi como prototipo y la cepa A6, es actualmente raro, aunque parece que fue el genotipo predominante hasta los años 60 del siglo pasado (125). Finalmente, el genotipo 3 parece tener su origen en África (3a, que incluye al prototipo V9 y 3b al D91.1) (37, 132, 157, 158, 172).

3.3 Otros virus exantemáticos.

3.3.1 Adenovirus.

Los AdV se han aislado en una gran variedad de mamíferos, aves y anfibios. La familia *Adenoviridae* incluye cuatro géneros: el género *Mastadenovirus* de mamíferos (53 afectan al hombre, dividido en siete subgrupos, A-G), el género *Aviadenovirus* de aves, *Atadenovirus* de mamíferos, pájaros y reptiles y *Siadenovirus* de aves de corral y anfibios (48, 161). Solo la mitad de los 53 serotipos conocidos de *Mastadenovirus* que afectan a humanos, causan enfermedad (59). Los AdV tienen un diámetro entre 70-90 nm, con una simetría icosaédrica, sin envoltura y con ADN lineal bicatenario de 36-38 Kpb, con aproximadamente 40 genes. La cápsida presenta 240 proteínas en forma de hexones y 12 en forma de pentones (59). Los AdV son causa frecuente de infección en edad pediátrica y producen casi entre 2-7% de todas las enfermedades respiratorias agudas en niños menores de 5 años. Tienen distribución mundial en forma epidémica, endémica o casos esporádicos y están presentes todo el año, principalmente en climas templados. Se transmiten principalmente por vía respiratoria a través de aerosoles o por contacto de la mucosa conjuntival con manos o instrumentos contaminados, así como por vía fecal-oral. También puede llegar al organismo a través de fomites o agua contaminada, incluso de piscinas. La

transmisión es particularmente efectiva cuando la densidad de población de individuos susceptibles es alta (48, 59, 161, 181).

La mitad de las infecciones son subclínicas y la mayoría autolimitadas, e inducen inmunidad específica que no evita la infección por serotipos diferentes. El período de incubación es de 2-14 días. Producen infecciones respiratorias, conjuntivitis, infecciones gastrointestinales, cistitis hemorrágica, exantema e infecciones en inmunodeprimidos.

Dependiendo de la presentación clínica, las muestras apropiadas para el diagnóstico microbiológico de AdV son diferentes e incluyen muestras de heces, lavados nasofaríngeos, exudados faríngeos, hisopado conjuntival, lavado broncoalveolar, orina y tejido de biopsia o autopsia, analizadas mediante detección de antígenos por inmunofluorescencia, inmunoblot, aislamiento en células susceptibles y detección de genomas por PCR. La serología es de utilidad con fines epidemiológicos (27).

Pocos datos se han publicado de exantemas producidos por AdV. De Moraes *et al.* (2011) detectaron 7 casos de exantemas morbiliformes por AdV en niños <10 años de un total de 519 muestras de pacientes con fiebre y exantema confirmados por el laboratorio, ocurrido entre el 1 de mayo de 2002 y 30 de mayo 2003, en Campinas, Brasil (49). Además, Casas *et al.* (2005) detectaron los AdV 4 y 5 mediante aislamiento viral y PCR en cuatro niños con exantema morbiliforme y fiebre, vacunados con vacuna TV (30). También, Ramsay *et al.* (2002) detectaron 7 casos de exantemas morbiliformes por AdV de serotipos 1 (4 niños), 2 (2 niños) y 3 (un niño), una de ellas combinada con infección por estreptococo del grupo A, en niños con alta cobertura vacunal para sarampión y rubéola (140). En otro estudio del año 2002 en el que se comparan los síntomas clínicos de niños con neumonía por AdV y niños con neumonía por otras causas, se detecta una frecuencia significativamente mayor de exantema, entre otros síntomas extrapulmonares, en los pacientes con neumonía por AdV que en los pacientes con neumonía sin AdV (63).

3.3.2 Enterovirus.

El género EV pertenece a la familia *Picornaviridae*. Los EV son pequeños (25-30 nm), sin envoltura, con una cápsida de simetría icosaédrica compuesta por cuatro proteínas estructurales (VP1-4) y con un ARN monocatenario de polaridad positiva, de aproximadamente 7-8 Kb. Este género lo comprende un grupo diverso de 10 especies, de los cuales siete están asociados con un amplio espectro de enfermedades agudas y crónicas en humanos. El género contiene más de 100 serotipos diferentes, comprendidos por poliovirus, coxsackievirus A y B, echovirus y los nuevos EV, los cuales están agrupados en cuatro especies: HEV-A, HEV-B, HEV-C y HEV-D, siendo en el HEV-C, donde están incluidos los virus de la polio. Algunos serotipos no se han podido asignar todavía a ninguna especie. Desde 1970 se ha asignado el nombre de los nuevos EV con una numeración consecutiva empezando con EV-68. Recientemente, los rinovirus también han sido incluidos en los EV (98, 141).

Muchas infecciones por EV son clínicamente inaparentes o asintomáticas, produciendo portadores sanos, principalmente en niños jóvenes. La vía de transmisión es respiratoria y oral-fecal, replicándose bien en faringe e intestino, y se excretan en las heces durante largos períodos de tiempo, mucho más que en secreciones respiratorias. En un pequeño porcentaje de casos, da lugar a meningitis aséptica y más raramente a otras enfermedades neurológicas más graves como encefalomielitis, ataxia cerebelar, síndrome de Guillain-Barré, mielitis transversa y poliomyelitis, entre otras. La poliomyelitis es una infección aguda que afecta de forma grave al sistema nervioso central (SNC), con destrucción de las neuronas motoras de la médula espinal, dando lugar a una parálisis flácida. Además, producen una variedad de enfermedades que incluyen un síndrome febril inespecífico sobre todo en lactantes menores de 3 meses, herpangina, faringitis linfonodular aguda, mialgia epidémica (pleurodinia o enfermedad de Bornholm), miositis; conjuntivitis aguda hemorrágica, síndrome mano-pie-boca, miopericarditis, pancreatitis, resfriado común, bronquitis aguda, bronquiolitis, neumonía, exantema y enantema cutáneo, manifestaciones gastrointestinales como diarrea, vómitos y dolor abdominal. Se han relacionado también con

malformaciones congénitas y algunas formas de diabetes mellitus dependiente de insulina.

La infección durante el embarazo puede ser causa de aborto o prematuridad durante el primer trimestre de la gestación. Los recién nacidos infectados pueden ser asintomáticos o presentar diferentes rango de enfermedades como fiebre de origen desconocido que suele acompañarse de meningitis aséptica o exantema, y síndromes de encefalomiocarditis y hepatitis-hemorrágica (184). Los coxsackie B y algunos enterovirus como el 11 son especialmente frecuentes.

La mayoría de los EV crece bien en cultivo celular, siendo esta la base de su detección con fines diagnósticos. La detección de genomas permite aumentar la sensibilidad y detectar algunos tipos que no crecen en cultivo (69).

Muchos EV pueden también producir exantemas semejantes a los de rubéola y sarampión, con fiebre y algunas veces, faringitis, especialmente en niños (184). Se ha detectado infección por EV en niños vacunados frente a sarampión y rubéola que presentaban exantema morbiliforme (47, 140). En varios estudios se ha encontrado que los niños menores de 5 años con meningitis aséptica o enfermedad severa del sistema nervioso central, presentan exantema (104, 169, 196). Davidkin *et al.* (1998), detectaron el virus en el 9% de 368 niños finlandeses con fiebre y exantema ocurrido entre 1983 y 1995 (47). En otro estudio, Ramsay *et al.* (2002) detectaron EV en 9 (5%) de 195 niños ingleses con exantema morbiliforme ocurrido entre 1996 y 1998 (140). En un estudio reciente, de Moraes *et al.* (2011) detectaron EV en 9 (1,7%) de 519 personas brasileñas con fiebre y exantema confirmados por el laboratorio, ocurrido entre 1 de mayo 2002 y 30 de mayo 2003. De estas 9 personas, 7 fueron niños <10 años, 1 niño entre 10 y 14 años y 1 adulto entre 20 y 29 años (49).

Además, algunos estudios afirman que en la enfermedad por EV en neonatos y en brotes en neonatos ocurridos intrahospitalariamente, la presencia de exantema es uno de los síntomas clínicos (11, 12, 101, 165, 166).

3.3.3 Herpesvirus.

La familia *Herpesviridae* contiene a varios patógenos humanos de gran importancia para la salud pública, mostrando un amplio espectro de enfermedades asociadas. Poseen un ADN lineal de doble cadena contenido en una cápsida icosaédrica de 162 capsómeros, rodeada por una envuelta lipoproteica de 110 a 220 nm de diámetro, que proviene de la membrana nuclear de la célula infectada y que contiene espículas de glicoproteínas virales de aproximadamente 8 nm de longitud. Entre la cápsida y la envuelta se encuentra una estructura amorfa, en ocasiones asimétrica conocida como tegumento, la cual está constituida por proteínas e hidratos de carbono. Una de las propiedades más importantes de estos virus, es su capacidad para establecer infecciones persistentes o latentes con reactivaciones más o menos frecuentes durante la vida. La latencia se produce en células nerviosas (herpesvirus neurotropos) o linfoides (herpesvirus linfotropos).

Herpesvirus humano 6 (HHV-6): Es miembro del género *Roseolovirus* de la subfamilia *Betaherpesvirinae* y es un herpesvirus linfotropo que produce latencia predominantemente en células T. Más del 95% de la población humana adquiere la infección antes de los 2 años de edad, produciendo una enfermedad común de la infancia conocida como exantema súbito (roseola infantum o sexta enfermedad) y síndrome febril inespecífico. Existen dos variantes del virus, variante A y B, las cuales difieren una de otra por cerca de 8% a nivel de nucleótidos. La variante B esta implicada en la mayoría de las enfermedades comunes relacionadas con infecciones por el HHV-6, incluyendo el exantema súbito, mientras que la variante A ha sido asociada con varias enfermedades neurológicas, reflejando su neurotropismo (142). Las complicaciones clínicas propuestas que están asociadas directamente al HHV-6 son leucopenia (síndrome similar a la mononucleosis), meningoencefalitis, hepatitis fulminante y neumonía intersticial, las cuales son infrecuentes en la infancia. Se produce la reactivación del virus más frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos que en individuos sanos, sin síntomas o con un síndrome febril inespecífico.

El diagnóstico de la infección aguda se realiza por detección de IgM específica utilizando técnicas de inmunofluorescencia y ELISA, aunque se pueden producir reacciones cruzadas con HHV-7, HHV-4 y HHV-5; o por detección del ADN mediante PCR en tiempo final (cualitativa) o tiempo real (cuantitativa) (138, 142).

Citomegalovirus humano (HHV-5): El CMV es un herpesvirus ubicuo y causa común de enfermedad en humanos. Es el miembro más grande de los Herpesvirus. Pertenecce al género *Cytomegalovirus* (prototipo de este género) de la subfamilia *Betaherpesvirinae* y es un herpesvirus linfotropo. La infección en hospedadores normales está raramente asociada a enfermedad. La primoinfección suele producirse en la infancia siendo generalmente asintomática. Sin embargo, en niños mayores, adultos y en personas transfundidas con sangre infectada, se puede producir un síndrome semejante a mononucleosis infecciosa. Estas infecciones primarias pueden, en ocasiones, cursar con exantema. El CMV causa la infección viral congénita más frecuente. En una revisión reciente de múltiples estudios encontraron que el 13% de los fetos infectados son sintomáticos al nacer y el 0,5% fallecen. Las madres seronegativas infectadas en el embarazo tienen un riesgo más alto de transmitir el virus y afectar al feto comparado con las mujeres que son seropositivas en el momento de la concepción, pero los niños de este grupo también pueden sufrir secuelas (22). En pacientes inmunodeprimidos se produce un síndrome febril con malestar general, artromialgia, leucopenia, linfocitosis atípica, trombocitopenia y elevación de transaminasas. En pacientes con sida, la retinitis es la manifestación clínica más común, seguida por las enfermedades gastrointestinales y encefalitis. Desde la introducción de la terapia antirretroviral, la enfermedad por CMV ha caído dramáticamente y ocurre ahora más frecuentemente en pacientes que no están recibiendo terapia antirretroviral o presentan fallo a la terapia (22, 118). En los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido la acción directa del virus puede producir manifestaciones indistinguibles del rechazo al injerto como hepatitis, gastroenteritis, glomerulonefritis necrosante, miocarditis, neumonía o pancreatitis.

En el diagnóstico de laboratorio, el cultivo celular en fibroblastos humanos por el sistema de “shell-vial” presenta la mejor predictividad en sangre debido a que incrementa la sensibilidad, aunque sigue siendo baja comparada con la PCR (94). Por otra parte, también se puede detectar el antígeno de la fosfoproteína de matriz pp65 en leucocitos de sangre periférica y en líquido cefalorraquídeo por medio de la técnica denominada antigenemia que es mucho más sensible y específica que el cultivo celular. Además, es un método semi-cuantitativo. Sin embargo, la evaluación de los resultados adolece de cierta carga de subjetividad (94). Los métodos cuantitativos de detección de ADN vírico (PCR a tiempo real) son una alternativa a la antigenemia muy extendida. Por último, es difícil la interpretación del significado de los hallazgos positivos en la población adulta debido al alto porcentaje de seroprevalencia y en particular en las reactivaciones en infecciones latentes (94, 134). Esta técnica sigue siendo muy útil para el diagnóstico de primoinfección, como es en la producción de exantemas.

Virus Epstein-Barr (HHV-4): El EBV es un herpesvirus ubicuo que causa mononucleosis infecciosa aguda y se considera un factor en el desarrollo del síndrome de Duncan, distintos tumores (carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt o enfermedad de Hodgkin) y otros trastornos linfoproliferativos en personas inmunodeprimidas. Perteneció al género *Lymphocryptovirus* de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae* y es un herpesvirus linfotropo. Presenta un genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 185 Kb, lineal durante la fase lítica y circular durante la fase latente.

La mayor parte de infecciones primarias por EBV en niños menores de 10 años son asintomáticas o muy leves. En adolescentes y adultos jóvenes, la manifestación clínica más característica es la mononucleosis infecciosa en 35 a 75% de infectados, que puede cursar ocasionalmente con un exantema, especialmente en pacientes tratados con ampicilina, ya que un síntoma temprano de la mononucleosis es una faringitis exudativa que puede confundirse con la faringitis estreptocócica. La enfermedad puede terminar

en 2-3 semanas, pero también puede producir una infección crónica activa en la convalecencia, con una duración mayor de 6 meses.

La PCR es la técnica de elección para detectar y cuantificar EBV en fluidos corporales y también puede utilizarse para cuantificar el virus en muestras de tejido. En la mononucleosis infecciosa, la mera detección cualitativa del genoma no es diagnóstica, ya que el virus está presente con mucha frecuencia en portadores sanos. Por ello, el diagnóstico de la primoinfección y de la mononucleosis infecciosa se debe apoyar en técnicas serológicas que demuestren infección reciente. La prueba que detecta anticuerpos heterófilos de clase IgM, aunque es una prueba diagnóstica indirecta para EBV, es sensible, sencilla y rápida, y suele ser positiva en el 60% de casos durante los primeros 10 días de la enfermedad, aunque la reactividad puede aparecer más tarde y persistir meses o hasta un año. Sin embargo, en el 40% de niños menores de 4 años y jóvenes, la enfermedad cursa con frecuencia sin estos anticuerpos heterófilos. Por lo tanto, se pueden producir resultados falsos negativos y se debe recurrir a la detección de anticuerpos específicos. La primoinfección se caracteriza por la producción de anticuerpos IgM primarios anti-VCA (antígeno de la cápsida vírica) en ausencia de anticuerpos IgG de latencia anti-EBNA1 (antígeno nuclear). Los anticuerpos IgG anti-VCA pueden estar presentes en infecciones agudas, pero en cantidades más bajas que los anticuerpos IgM anti-VCA. Durante la convalecencia (desde la tercera semana al tercer mes después del inicio de la enfermedad) los anticuerpos IgM anti-VCA decaen, mientras los anticuerpos IgG anti-VCA aumentan y persisten para toda la vida. Entre el tercer y sexto mes, los anticuerpos IgM anti-VCA desaparecen, mientras que los anticuerpos IgG anti-EBNA1 empiezan a detectarse y también persisten para toda la vida. Los tres antígenos pueden estar presentes en la infección primaria tardía o en reactivaciones subclínicas, pero pueden ser diferenciadas fácilmente desarrollando la prueba de avidéz para las IgG (128). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen reacciones cruzadas entre CMV y EBV. Los anticuerpos anti-EBNA aparecen después de los IgG anti-VCA a partir del segundo o tercer mes de la primoinfección al ser aquellos antígenos de latencia. Por lo tanto, la

primoinfección reciente también puede diagnosticarse por una seroconversión o una elevación en el título de anti-EBNA (52, 107).

3.3.4 Virus del dengue.

El DENV es miembro de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* y es transmitido por los mosquitos *Aedes sp.* Pertenecen a un grupo grande y heterogéneo de virus llamado arbovirus. El DENV lo comprenden cuatro serotipos distintos antigénicamente, DENV 1-4. Los viriones son esféricos, con un diámetro entre 40-60 nm, y contienen una nucleocápsida de simetría poliédrica, la cual está cubierta por una envuelta lipídica de origen celular, que incluye espículas en su superficie. El genoma está formado por una molécula de ARN lineal monocatenario de sentido positivo, de aproximadamente 11 Kb de longitud (76).

La infección por DENV puede presentar síntomas con un amplio rango de severidad, desde una condición asintomática y fiebre de dengue clásica, a formas que pueden amenazar la vida, tales como fiebre hemorrágica y shock por dengue, asociados a reinfecciones o infecciones secundarias, por cualquiera de los cuatro serotipos conocidos (170). El inicio de la fiebre, que es una forma leve de la infección por DENV, puede ser brusco, o bien, puede presentarse junto con síntomas prodrómicos tales como malestar, escalofríos y dolor de cabeza. Pronto se presentan dolores, especialmente en la espalda, articulaciones, músculos y globos oculares. El exantema (maculopapular o escarlatiniforme) puede aparecer al tercer o cuarto día y dura de 24 a 72 h desvaneciéndose sin descamación. Entre otras enfermedades el dengue se puede confundir con rubéola por lo cual es necesario establecer un diagnóstico diferencial en países endémicos.

Los métodos específicos utilizados para el diagnóstico del DENV incluyen aislamiento viral en cultivo celular, serología y técnicas de detección de genomas como la RT-PCR. La IgM específica de dengue es detectable por técnica de ELISA en infecciones agudas o secundarias sobre el quinto día del comienzo de la enfermedad, y disminuye en 30 a 60 días desde el inicio de la infección.

Es importante la relación entre los anticuerpos IgM/IgG como también el índice de avidez de la IgG, siendo ambos mayores en infecciones secundarias, lo que sirve para distinguir entre infección primaria o secundaria en caso de dengue agudo y para identificar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar las formas graves de la enfermedad. El diagnóstico serológico presenta el problema de la reacción cruzada existente con otros flavivirus y, por otro lado, que los anticuerpos IgM anti-DENV empiezan a producirse un poco tarde, a partir del quinto día. Además, se puede realizar el aislamiento del virus, aunque es muy lento (entre 10-14 días), o la detección de su genoma mediante RT-PCR en un suero de fase aguda y en diversos tejidos *post mortem* (55, 76).

OBJETIVOS

1. **Mejora de la sensibilidad para detección de virus de la rubéola de una técnica de PCR múltiple para detección simultánea de virus del sarampión, virus de la rubéola y parvovirus B19** de la cartera de servicios del CNM, cuyo rendimiento para el diagnóstico de infecciones por RUBV se había mostrado poco satisfactorio.
2. **Desarrollo de tecnología para genotipificación del virus de la rubéola** basada en las recomendaciones de la OMS para la armonización en la caracterización genotípica del RUBV.
3. **Estudio de la circulación de los genotipos del virus de la rubéola en España entre los años 1998 y 2009, y de la variabilidad del virus de la rubéola en el contexto de brotes**, con el fin de establecer los patrones de circulación epidemiológica y evaluar la situación de partida de cara a la implantación del Plan Nacional de Eliminación en España.
4. **Desarrollo y evaluación de una técnica para la caracterización de la respuesta inmune específica e inespecífica contra el virus de la rubéola**, para tratar de discriminar entre los resultados falsos positivos de los positivos verdaderos en el diagnóstico serológico de la infección aguda por este virus, especialmente en pacientes embarazadas, debido a su implicación como causa contemplada en los supuestos amparados por la ley para realización de aborto terapéutico por los posible efectos teratogénicos sobre el feto.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS Y CEPAS

1.1 Cepas de virus.

Los experimentos de estandarización de la RT-PCR para el genotipado de RUBV se realizaron con la cepa vacunal RA27/3 de RUBV (Beecham, Madrid). Esta cepa se propagó en las líneas celulares Vero, Vero E6 y en fibroblastos de pulmón fetal de la colección del CNM para su posterior mantenimiento a -80°C .

Se usaron cepas salvajes de virus parainfluenza 1, 2, 3, 4A y 4B, AdV 5, virus de la parotiditis, virus respiratorio sincitial A y B y virus de la encefalitis equina del este, procedentes de la colección del CNM, para evaluar la especificidad del ensayo.

1.2 Muestras de un brote de RUBV declarado en la Comunidad de Madrid en 2004/2005.

En los años 2004/2005, se declaró un brote de rubéola en la Comunidad de Madrid que afectó a 460 personas, especialmente a hombres jóvenes españoles y a latinoamericanos de ambos sexos, principalmente Colombianos y Ecuatorianos (1). Este brote ocurrió desde la semana 40/2004 hasta la 35/2005. De entre las muestras de este brote recibidas en el CNM para su estudio se seleccionaron otros 75 casos clínicos con un juego de muestras completas (orinas, sueros y exudados faríngeos), las cuales tenían un porcentaje de positividad de 14,3% en orina, 31,0 en suero y 52,4% en exudado faríngeo con la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos sin modificar (121) (Tabla 9) y disponibles para evaluar la modificación que se le hizo a esta técnica, encaminadas a la mejora de su sensibilidad para la detección del RUBV. Se utilizaron muestras de cuarenta de estos casos para el estudio de genotipado (ver apartado 1.4).

1.3 Muestras de un brote de RUBV declarado en Algeciras en 2008.

Se han estudiado muestras de suero, exudado nasofaríngeo y orina positivas a ARN de virus de la rubéola por RT-PCR múltiple (ver más adelante) de 18 casos de rubéola que fueron notificados inicialmente como casos

sospechosos de sarampión en el contexto de un brote. Todos ellos nacieron en España (Algeciras y en otros municipios de la comarca) y ninguno había viajado recientemente al extranjero. Este brote ocurrió entre la semana 5/2008 hasta la 16/2008. El rango de edad oscila entre los 18 meses y los 40 años; el 83% (15/18) son adultos jóvenes (mayores de 19 años). La mitad son mujeres y 7/9 estaban en edad fértil. Ningún caso estaba vacunado. Además, se analizaron dos casos esporádicos de la Comunidad de Madrid, uno de Alicante y uno de Ceuta, del mismo año del brote.

Los especímenes fueron tomados y procesados de acuerdo con las recomendaciones de OMS (194).

Estos 18 casos quedan incluidos en los del apartado 1.4.

1.4 Muestras retrospectivas de hisopado faríngeo, suero, LCR, sangre, saliva, líquido amniótico u orina de pacientes con sospecha clínica inicial de sarampión que presentaron al hacer diagnóstico diferencial marcadores de infección reciente por RUBV.

Para poder determinar los genotipos de RUBV que han circulado en España desde 1998 a 2009 se extrajeron de las colecciones del CNM un total de 150 muestras, 21 orinas, 46 sueros, 71 exudados faríngeos, 5 LCR, 4 sangres, 2 salivas y 1 líquido amniótico (Tabla 10), procedentes de 150 casos positivos a ARN del RUBV por RT-PCR. Todos ellos eran casos sospechosos de sarampión y rubéola estudiados en el contexto del plan nacional de eliminación del sarampión y rubéola, pero que mostraron resultados positivos o equívocos para IgM de rubéola y fueron negativos al MeV. Se incluyen 40 casos del brote de Madrid (apartado 1.2) y 18 del brote de Algeciras (apartado 1.3). Las muestras de orina se centrifugaron a 2.500 rpm durante 15 min. a 4°C y el sedimento se resuspendió en 2 ml de medio EMEM modificado con hepes, siguiendo las instrucciones de la OMS (28). Después de tratar los sedimentos de orina, los exudados faríngeos y las otras muestras clínicas, se extrajo su ácido nucleico como en la sección 4.2 y luego, aquellas que resultaron positivas, se genotiparon como se describe en la sección 4.5 (110).

1.5. Sueros de archivo de la colección del ISCIII con marcadores de infección reciente o pasada por virus de la rubéola.

Estas 369 muestras se han dividido en tres grupos. **Grupo 1**, 279 muestras de sueros IgM positivos e IgG de baja avidez para RUBV recogidos entre 1978 y 2008. Las muestras de este subgrupo se utilizaron para tratar de recuperar ARN vírico para su genotipado y para la caracterización de la respuesta inmune. **Grupo 2 y 3**, constituido por 90 sueros con anticuerpos frente al RUBV extraídos entre 2004 y 2008. **Grupo 2**, cuarenta y cinco de ellos presentaban IgM positiva e IgG positiva de alta avidez para RUBV y **Grupo 3**, otros 45 eran IgM negativos e IgG positivos. Se utilizaron para el estudio de caracterización de la respuesta inmune específica e inespecífica. Las condiciones de almacenamiento fueron diferentes para cada grupo de muestras: las de los dos últimos grupos se mantuvieron congeladas a -20°C , sin embargo las del grupo 1, fueron congeladas y descongeladas un número de veces desconocido con el fin de realizar pruebas serológicas.

1.6. Muestras de líquido amniótico de mujeres embarazadas con sospecha de infección por virus de la rubéola negativas por RT-PCR múltiple frente a virus exantemáticos.

Un total de 65 líquidos amnióticos recogidos entre 2004 y 2008, inicialmente negativos por la técnica de RT-PCR múltiple para virus exantemáticos sin modificar (121), las cuales, fueron evaluadas nuevamente tras las modificaciones efectuadas para mejora de la sensibilidad.

Estas muestras de líquido amnióticos, se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso.

2. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

2.1 Rubéola.

El diagnóstico serológico de infección aguda por el RUBV se llevó a cabo mediante detección de IgM específica por ELISA indirecto (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EEUU) y/o de captura de cadenas pesadas (Platelia Rubella IgM, BIO-RAD, Francia). Antes de utilizar métodos

indirectos las muestras fueron tratadas con una IgG antihumana (RF Absorbens, Dade-Behring, Alemania) para eliminar la IgG y evitar así falsos positivos debidos al factor reumatoide. La Avidéz de IgG se caracterizó realizando dos determinaciones simultáneas, la primera en la forma convencional y la segunda añadiendo un lavado con urea 8 M después de la incubación antígeno-anticuerpo. Se calculó el índice de avidéz como el cociente de la absorbancia obtenida en el ensayo en condiciones desnaturalizantes respecto a la absorbancia en condiciones convencionales, cociente que se multiplicó por 100 (50). Todos los métodos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR

Los aislamientos se realizaron según protocolo ya descrito previamente (121) en células Vero, Vero clon E6 y fibroblastos de pulmón fetal humano. Todas las muestras fueron tratadas con una solución descontaminante (penicilina 8.000 UI/ml, estreptomicina 8.000 µg/ml, gentamicina 1.600 µg/ml, anfotericina B 25,6 µg/ml y suero bovino fetal-SBF al 50%) antes de la inoculación en cultivos celulares. Las muestras de orina se neutralizaron con hidróxido sódico antes de obtener las células del sedimento urinario. Se inocularon 200 µl de muestra tratada en cada tubo de cultivo celular. El medio de cultivo utilizado fue *Eagle Minimal Essential Medium* (EMEM) (Sigma, BRL, Life Technologies Inc., Escocia) con SBF (10% para crecimiento y 2% para mantenimiento celular) más solución descontaminante y bicarbonato sódico (0,028% para medio de crecimiento y 0,044% para medio de mantenimiento). Los tubos inoculados fueron monitorizados para la aparición de ECP dos veces a la semana. Después de 7 días sin ECP, se raspó el cultivo celular, se recogió y se utilizó como inóculo para monocapas frescas. Todos los tubos, con o sin ECP después del segundo subcultivo (7 días), fueron monitorizados para el RUBV por medio de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos [Anticuerpos Monoclonales Anti-Rubéola en Ratón; Chemicon (Millipore) International, Inc., CA, EEUU], seguido por una inmunotinción con anticuerpos anti-ratón conjugados con

isotiocianato de fluoresceína (IgG Anti-Ratón Conjugado con ITCF; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). Además, los sobrenadantes celulares fueron analizados por RT-PCR múltiple para virus exantemáticos (121).

4. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA

Durante el uso de técnicas de PCR se tomaron precauciones para evitar contaminaciones por arrastre. Así, se utilizaron puntas de pipeta con barrera contra aerosoles en cuatro áreas diferentes para: preparación de mezclas de reactivos, extracción de la muestra y adición del extracto a tubos de primera amplificación, segunda amplificación y detección de los productos de amplificación. En cada área se utilizaron batas de laboratorio, materiales de plástico y vidrio, y micropipetas diferentes. En las tres primeras se trabajó en cabina de flujo laminar de bioseguridad de clase II para el manejo de muestras clínicas.

4.1 Extracción de ácidos nucleicos.

Se llevaron a cabo tres métodos distintos de extracción de ácidos nucleicos. Desde las muestras y aislamientos en cultivos celulares se extrajeron utilizando el extractor automático MagNA Pure LC, versión 3.01 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo el protocolo para ácidos nucleicos totales con lisis externa y partiendo de 100 µl de muestra para acabar eluyendo en 50 µl de tampón de elución.

En el caso de sobrenadantes de cultivo celular se utilizó un método manual basado en extracción con tiocianato de guanidinio y posterior precipitación con alcohol (31) partiendo de 100 µl de muestra para resuspender el sedimento en 20 µl de agua. Y por último, se utilizó el método de extracción manual de Trizol, basado en extracción con tiocianato de guanidinio, cloroformo, isopropanol para precipitar y etanol 70% para lavar (74) partiendo de 50 µl de muestra para resuspender el sedimento en 20 µl de agua.

4.2 Ensayo de extracción con partículas magnéticas cubiertas con estreptavidina.

A fin de intentar mejorar el rendimiento de los métodos de extracción anteriores, se puso a punto este procedimiento basado en esferas magnéticas cubiertas de estreptavidina siguiendo recomendaciones de la casa comercial (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen Dynal AS, Olso, Noruega).

4.3 Transcripción reversa y amplificación simultánea para Virus Exantemáticos (virus del sarampión, virus de la rubéola y parvovirus B19).

Se llevo a cabo según protocolo estandarizado por Mosquera *et al.* (2002) (121) y modificado por Martínez-Torres *et al.* (2009) (110) (ver apartado 1 de Resultados).

4.4 Mejora de la sensibilidad mediante el uso de coadyuvantes.

Los coadyuvantes que se ensayaron y sus concentraciones fueron: dimetil sulfoxido (DMSO) (5%, 10%, 15%, 20%), β -mercaptoetanol (β ME) (0,02%, 0,06%, 0,1%, 0,2%), Glicerol (5%, 10%, 15%, 20%) y Betaína (5 M).

Cada uno de ellos se ensayó tanto individualmente como combinado con los otros, tal y como se describe en el apartado 1 de resultados.

4.5 Diseño de oligonucleótidos para genotipificación.

Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar la ventana de 739 nt del gen de la glicoproteína de envuelta E1 recomendada por la OMS (nt 8731-9469) (193). Esta secuencia codifica para los aa 159-404 del gen E1. Se utilizó el método Clustal W disponible en los programas BioEdit 7.0.9 (79) y MEGA v4.0 (167) para alinear las secuencias genómicas de la glicoproteína E1 disponibles en la base de datos GenBank (septiembre 2007). Los alineamientos fueron utilizados para diseñar los oligonucleótidos (Figura 22).

4.6 Ajuste de parámetros de primera reacción de PCR y segunda reacción de PCR o “nested” para genotipado.

Los parámetros que se estandarizaron fueron las concentraciones de SO_4Mg (Figura 23 y 24), desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's: dATP, dGTP, dTTP, dCTP) e iniciadores (Figura 25), así como las temperaturas de hibridación (Figura 26) y de desnaturalización (Figura 27) para la primera reacción. Para la segunda reacción de PCR o “nested” los parámetros que se estandarizaron fueron similares a los de la primera reacción (Figuras 28 a 33).

4.7 Secuenciación de ácidos nucleicos.

Los productos de PCR fueron purificados según protocolo previamente descrito (124) basado en precipitación con alcoholes. Desde marzo del año 2008 se utilizaron métodos comerciales basados en columnas: Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (Madison, WI, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron en ambas direcciones utilizando el Kit ABI Prism Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA, EEUU). Se utilizaron los iniciadores de segunda reacción de la PCR de genotipificación. Dicha reacción de secuenciación se realizó en un termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research, Watertown, MA, EEUU) en las siguientes condiciones: 94°C durante 3 min para desnaturalizar el ADN y 25 ciclos de 93°C 10 seg, 57°C 10 seg y 60°C 4 min. El protocolo incorporó betaína 5 M (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) para minimizar fallos asociados con moldes o genomas ricos en GC. Los productos de la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático (ABI Prism 3700 DNA sequencer, Applied Biosystems, Foster City, EEUU) en el Laboratorio de Genómica del CNM. La secuenciación se repitió en caso de ambigüedad de nucleótido.

4.8 Análisis de secuencias de ácidos nucleicos.

Las secuencias fueron ensambladas con la herramienta SeqMan disponible en el programa Lasergene 7.0 y alineadas utilizando el método Clustal W del programa BioEdit 7.0.9 (79). El análisis de distancias de las secuencias fue realizado con el programa MEGA v. 4.0 (167), siguiendo el método *Neighbor-*

Joining Kimura 2-parametros para 1.000 réplicas. Este análisis se basó en los 739 nt de la secuencia del gen E1, la cual es la ventana mínima aceptable definida por la OMS (193). Las secuencias de referencia (195) fueron incluidas en cada análisis.

Asimismo, se construyó el árbol filogenético según protocolo previamente descrito (13), usando inferencia Bayesiana con el programa MrBayes v. 3.1 (88), el cual utiliza el modelo evolutivo (GTR+CAT+I). Se dejaron correr dos carreras simultáneas e independientes con 8 cadenas, muestreando cada 500 generaciones. El apoyo estadístico de los nodos fue derivado del consenso mayoritario de los árboles muestreados, descartándose el 25% de los árboles iniciales como *burn-in*. Los árboles filogenéticos generados fueron visualizados con el programa TreeView 3.2 (130). Se consideró que un nodo estaba fuertemente apoyado cuando su probabilidad posterior era mayor o igual al 95%.

5. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

5.1 Titulación de la Vacuna del RUBV por la Técnica de Plaqueo de Dulbecco.

Se prepararon 2 placas de 12 pocillos con células Vero E6 al 70% de confluencia (para ensayo por duplicado de cinco diluciones de RUBV y un control negativo en cada placa) a partir de un frasco de cultivo de 175 cm² confluyente. Al día siguiente se hicieron diluciones seriadas en base 10, hasta 10⁻⁴, de la cepa vacunal RA27/3 del RUBV (Figura 12). Tras eliminar el medio y lavar una vez con medio EMEM sin SBF, se inoculó cada pocillo con 200 µl de cada dilución y se incubó durante 2 h a 37°C, con agitación cada 15 min. Durante la incubación, se preparó agar noble al 2%. Después de la incubación, se mezcló el agar noble con el EMEM 2X y se agregó 1 ml a cada pocillo. Se incubó en estufa de CO₂ al 5% y a 37°C durante seis días. Después de la incubación, se fijaron las células con formaldehído al 10% durante 30 min. Tras eliminar el formaldehído y quitar el agar con una espátula y con presión de H₂O muy suave, se tiñó cada pocillo con cristal violeta al 0,3% durante 10 min. Se lavó con una presión suave de H₂O, se

dejó secar a temperatura ambiente (TA) y se contaron las calvas de lisis para obtener el título viral. El título viral se obtuvo multiplicando el número de calvas contadas por el factor de dilución en ese pocillo (dilución seriada de base 10).

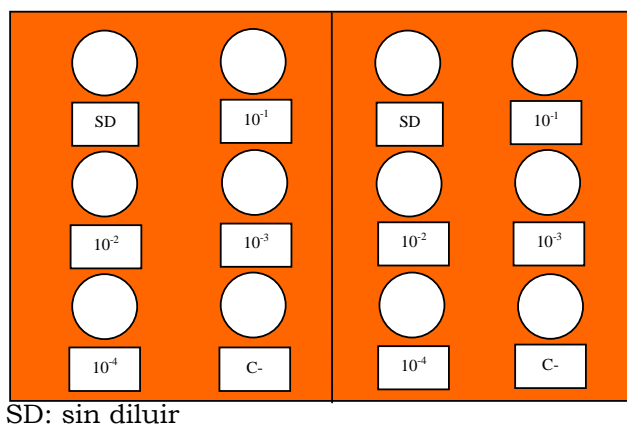


Figura 12. Esquema de la placa de 12 pocillos usada para hacer el ensayo de titulación viral.

5.2 Preparación de extracto purificado de virus.

La purificación del RUBV se llevó a cabo siguiendo un método descrito previamente (152) y que detallamos a continuación. Siete días después de la inoculación de cepa vacunal RA27/3 en tres frascos de 175 cm² con células Vero clon E6 como se describe en el apartado 3 de Materiales y Métodos, se rasparon, recogiendo el contenido celular en un tubo de centrifuga preparativa de 50 ml, para centrifugar a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C, a fin de clarificar la muestra. Luego, el sobrenadante se colocó en tubos de ultracentrifuga y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 h a 4°C. Después, el sobrenadante se descartó y el sedimento obtenido se resuspendió en 1.500 µl de EMEM, concentrando la muestra 30 veces. A continuación, esta mezcla se dispuso sobre un colchón de 30% de sacarosa y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 h a 4°C. El sedimento final se resuspendió en 100 µl de tampón Tris-Cloruro de Sodio-EDTA. La pureza y concentración de las fracciones virales obtenidas se analizaron al final del proceso mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Sodio-Dodecil-Sulfato

(SDS-PAGE), según se describe en el apartado 5.3 de Materiales y Métodos. Estas fracciones víricas purificadas se almacenaron a -80°C antes de su uso.

5.3 Técnica de Inmunodetección de Proteínas Mediante Transferencia a Membranas Sintéticas (*Western-Blotting*: WB).

La detección inmuno-específica de las proteínas se realizó según Towbin *et al.* (1979) (174) con algunas modificaciones. Se prepararon PAGE al 9% en presencia de SDS de un pocillo para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (100). Dichos geles fueron cargados con el extracto de proteínas totales (antígenos) de la cepa vacunal RA27/3 del RUBV descrito en la sección anterior (5.2), tratado con tampón de muestra 5x (0,08 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Glicerol, 0,01% Azul de Bromofenol) y 5% de β ME, sometiénolo a 190V durante 45 min. A continuación, estos geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa aplicando 200 mA de corriente durante 2 h y después, estas membranas fueron bloqueadas con leche descremada en PBS-0,1% Tween 20, en agitación durante 1 h a TA. Posteriormente, las membranas se colocaron en un dispositivo multipocillo que permite evaluar 40 sueros diferentes a la vez, (Mini Protein II Multipocillos, Bio Rad, EEUU) y se añadieron los sueros a evaluar, que se agitaron durante 1h a TA. Después, se les añadió el segundo anticuerpo, anti-IgG o anti-IgM humana conjugado con Peroxidasa (A0420 Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EEUU) y se agitaron por 1 h a TA. Finalmente, se les añade el sustrato y se revelan por quimioluminiscencia según indicaciones de la casa comercial (Amersham ECL Western-Blotting Detection Reagents, GE Healthcare Reino Unido Limited).

RESULTADOS

1. ENSAYO DE EXTRACCIÓN CON PARTÍCULAS MAGNÉTICAS CUBIERTAS CON ESTREPTAVIDINA.

A fin de intentar mejorar el rendimiento de los métodos de extracción, fundamentalmente de cara a intentar amplificar ARN del RUBV a partir de muestras de sueros de archivo, se puso a punto un método de extracción de ARN del RUBV por captura en esferas magnéticas a través de sondas específicas para el gen E1. Este método se estandarizó con una suspensión de 10 µg/µl de esferas magnéticas (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen Dynal AS, Olso, Noruega), la cual, se lavó dos veces durante 1 min. con 250 µl de solución A (0,1 M NaOH tratado con DEPC, 0,05 M NaCl tratado con DEPC). A continuación, se realizó un tercer lavado con 250 µl de solución B (0,1 M NaCl tratado con DEPC) y finalmente, se resuspendió en esta misma solución B, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se hicieron ensayos para estandarizar las concentraciones de sonda específica para el gen E1 marcada con biotina en el extremo 5' (Biot5'-CCCAGAGTGAGCTGCCACCA-3'), la temperatura y el tiempo de hibridación de esta sonda con el ARN de la cepa vacunal o las esferas magnéticas, la concentración de esferas magnéticas cubiertas con estreptavidina, la temperatura y el tiempo de hibridación de las esferas magnéticas con el complejo de sonda marcada con biotina y el ARN viral, y el complejo sonda-ARN eluido y sin eluir de las esferas magnéticas (Figura 13 a 18). Primeramente se realizó una lisis de las partículas virales con el tampón de lisis del método de extracción por precipitación (31) o el de extracción automática, mezclando 50 µl de muestra con 200 µl de buffer de lisis e incubando 10 min, a TA. A esta mezcla se le agregó 1.000 pmol de sonda marcada y se incubó a TA durante 1 h con movimiento continuo. El ARN hibridado se mezcló con 400 µg de partículas magnéticas cubiertas y se incubó durante toda la noche a TA en agitación (Figura 13). Finalmente, se lavó tres veces el pellet, con 250 µl de la solución 1 X B&W, para eliminar el material unido no-específicamente y se resuspendió con 15 a 20 µl de agua libre de nucleasas, que posteriormente se utilizó sin eluir (Figura 20) para la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemático (121).

Al comparar esta extracción con los tres métodos descritos en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos: la extracción por precipitación (31) (datos no mostrados), la de esferas magnéticas automatizada (Magna Pure) (Figura 13 y 18) y la extracción con Trizol (Figura 18) (74), no hubo una mejora en la sensibilidad, por lo que se siguió utilizando las técnicas habituales en el laboratorio de precipitación y de extracción automatizada por fijación no específica a esferas magnéticas (MagNa Pure LC).

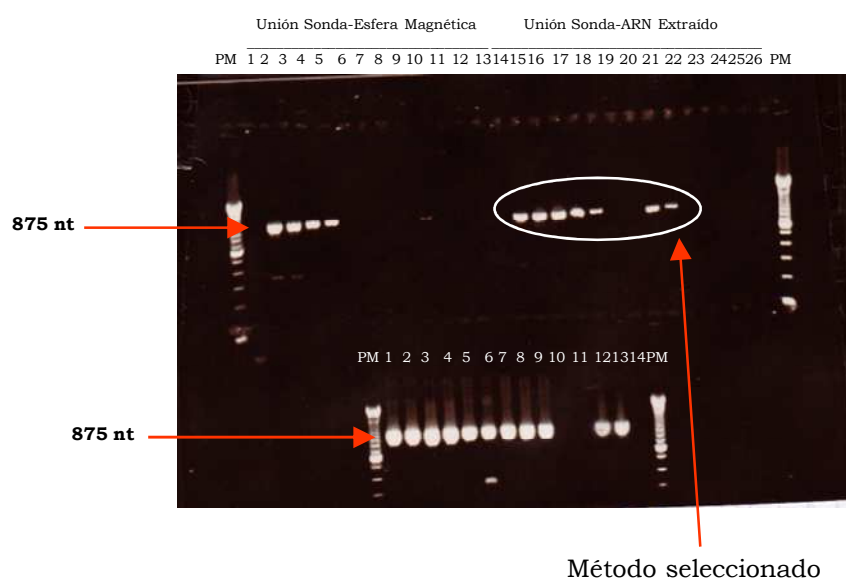


Figura 13: Curva de Calibración con dos Métodos de Extracción con Esferas Magnéticas. PM: marcador de peso molecular; Sección Superior: Pocillos 1 a 13: Unión de la Sonda Específica primero a las Esferas Magnéticas y luego a extractos de ARN de la Vac RUBV 10^{-0} a 10^{-12} ; Pocillos 14 a 26: Unión de la Sonda Específica primero a los extractos de ARN de la Vac RUBV 10^{-0} a 10^{-12} y luego a la Esferas Magnéticas; Sección Inferior: Pocillos 1 a 14: Extracción automática de la Vac RUBV 10^{-0} a 10^{-12} como control.

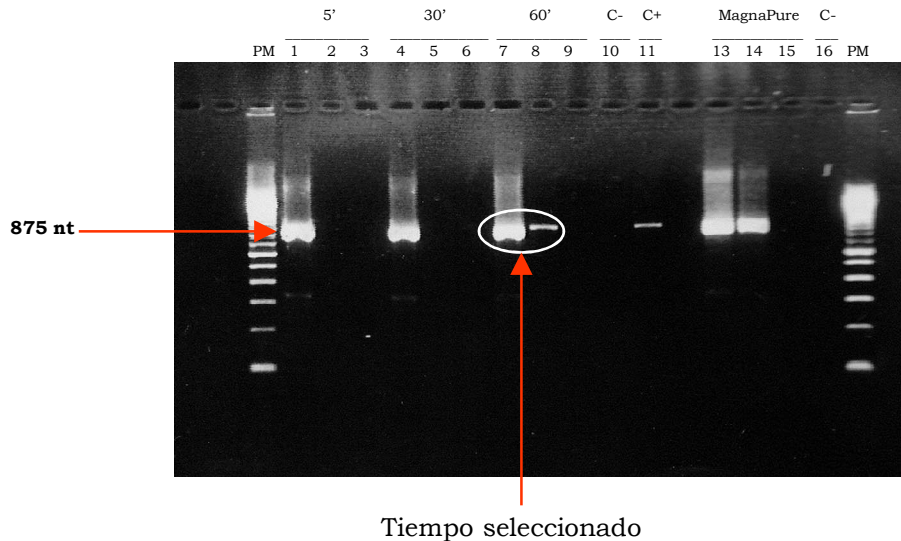


Figura 14: Estandarización de Tiempo de Unión a las Esferas Magnéticas. PM: marcador de peso molecular; Pocillos 1 a 3: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} durante 5 min (5'); Pocillos 4 a 6: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} durante 30 min (30'); Pocillos 7 a 9: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} durante 60 min (60'); Pocillo 10: Control de Reactivo (C-); Pocillo 11: Control Positivo Vac Rub extraída por extracción manual; Pocillos 13 a 15: Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} extraída automáticamente (Magna Pure); C-: Control Negativo .

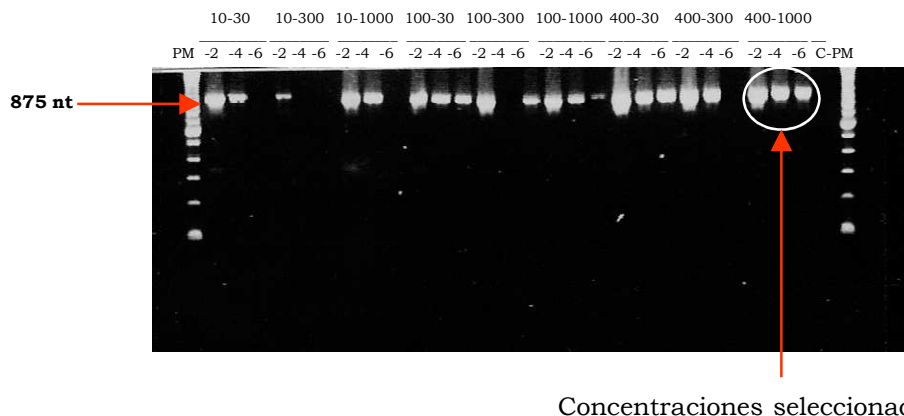


Figura 15: Estandarización de Concentración del Complejo Extracto de ARN-Sonda Específica y de Esferas Magnéticas. PM: marcador de peso molecular. Pocillos 1 a 3: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 30 pmol de Sonda y a 10 μ g de Esferas Magnéticas (EM); Pocillos 4 a 6: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 300 pmol de Sonda y a 10 μ g de EM; Pocillos 7 a 9: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 1000 pmol de Sonda y a 10 μ g de EM; Pocillos 10 a 12: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 30 pmol de Sonda y a 100 μ g de EM; Pocillos 13 a 15: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 300 pmol de Sonda y a 100 μ g de EM; Pocillos 16 a 18: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 1000 pmol de Sonda y a 100 μ g de EM; Pocillos 19 a 21: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 30 pmol de Sonda y a 400 μ g de EM; Pocillos 22 a 24: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 300 pmol de Sonda y a 400 μ g de EM; Pocillos 25 a 27: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} unido a 1000 pmol de Sonda y a 400 μ g de EM; C-: Control Negativo .

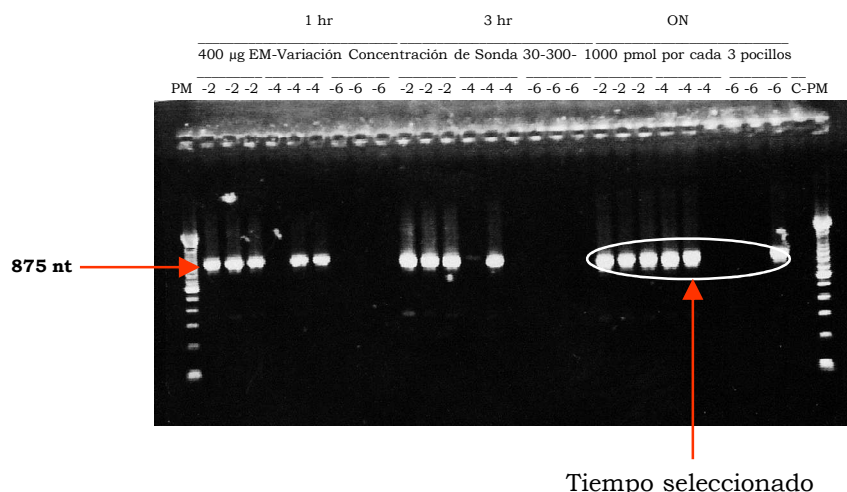


Figura 16: Estandarización de Tiempo de Unión de la Sonda Específica con el ARN Extraído. PM: marcador de peso molecular. El Complejo de Sonda y ARN Extraído se unieron a 400 µg EM. Pocillos 1 a 3: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-2} y 10^{-2} unido a 30, 3000 y 1000 pmol de Sonda, respectivamente; Pocillos 4 a 6: Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-4} y 10^{-4} unido a 30, 300 y 1000 pmol de Sonda, respectivamente; Pocillos 7 a 9: Vac RUBV 10^{-6} , 10^{-6} y 10^{-6} unido a 30, 300 y 1000 pmol de Sonda respectivamente. Pocillos 1 a 9 se incubaron durante 1 hr con las EM. Pocillos 10 a 18 son la misma presentación que los Pocillos 1 a 9 pero se incubaron durante 3 hr con las EM. Pocillos 19 a 27 son la misma presentación que los Pocillos 1 a 9 pero se incubaron toda la noche (ON) con las EM. C-: Control Negativo .

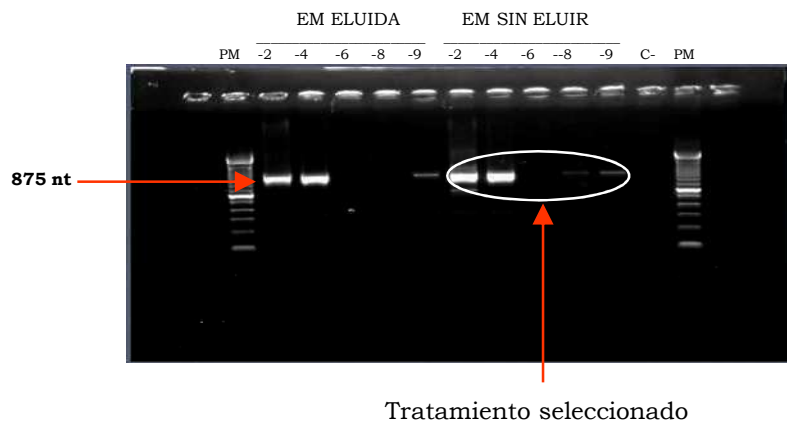


Figura 17: Curva de Calibración con Esferas Magnéticas Eluidas y Sin Eluir. El complejo ARN Extraído-Sonda fue eluido de las Esferas Magnéticas (EM) con 25 µl de agua libre de nucleasa tibia. PM: marcador de peso molecular. Pocillos 1 a 5: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con las EM eluidas; Pocillos 6 a 10: Vac RUBV 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con las EM sin eluir; C-: Control Negativo .

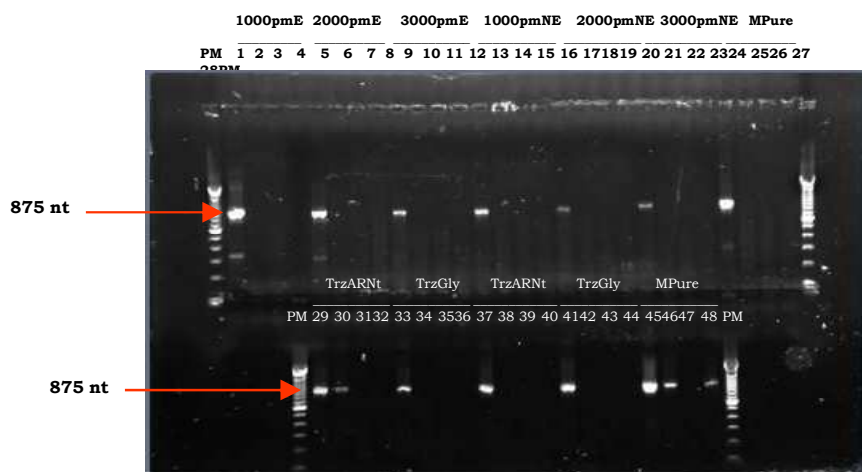


Figura 18: Comparación del método de extracción con esferas magnéticas con condiciones estandarizadas frente a otros métodos de extracción. PM: marcador de peso molecular; Sección Superior: Pocillos 1 a 4: Unión de 1000 pmol (pm) de Sonda Específica con extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el proceso de elución (E); Pocillos 5 a 8: Unión Comparación del Método de Extracción con Esferas Magnéticas con condiciones estandarizadas con otros Métodos de Extracción de 2000 pmol de Sonda Específica con extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el proceso de E; Pocillos 9 a 12: Unión de 3000 pmol de Sonda Específica con extracto de Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el proceso de E; Pocillos 13 a 16: Unión de 1000 pmol de Sonda Específica con extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el proceso no eluido (NE); Pocillos 17 a 20: Unión de 2000 pmol de Sonda Específica con extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el proceso NE; Pocillos 21 a 24: Unión de 3000 pmol de Sonda Específica con extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el proceso NE; Pocillos 25 a 28: Extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el método automático Magna Pure (MPure); Sección Inferior: Pocillos 29 a 32: Extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el método de Trizol (Trz) con Bromo-Cloro-Propano (BCP) y ARN de transferencia (ARNt) como acarreador de ARN; Pocillos 33 a 36: Extracto de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el método de Trz con BCP y Glicógeno (Gly) como acarreador de ARN; Pocillos 37 a 40: Extracto de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con el método de Trz sin BCP y ARNt como acarreador de ARN; Pocillos 41 a 44: Extractos de la Vac RUBV con el método de Trz sin BCP y Gly como acarreador de ARN; Extractos de la Vac RUBV 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} con la extracción automática MPure.

2. MEJORA DE LA SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE PARA VIRUS EXANTEMÁTICOS.

Debido a la baja sensibilidad observada en la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos en muestras clínicas (121) y tras la puesta a punto del ensayo de RT-PCR de genotipado, se decidió probar el efecto de incluir betaína 5 M en la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos en las mismas condiciones seleccionadas para RT-PCR de genotipado (ver apartado 4.4 de resultados). Es conocido que el genoma del RUBV es rico en GC

(69,5%) (40, 70, 105), lo cual hace difícil la retrotranscripción y la amplificación (35). Así, durante los experimentos de puesta a punto de una RT-PCR para genotipado de RUBV se comprobó que la betaína 5 M mejora ostensiblemente la sensibilidad (ver apartado 4.4 de materiales y métodos), ya que reduce la formación de estructuras secundarias en regiones ricas de GC tanto en el ARN como en el ADN, permitiendo un mejor acceso a la retrotranscriptasa y a la ADN polimerasa a la secuencia molde (82, 84). Por esta razón, se decidió observar el efecto de la inclusión de betaína 5 M en la mezcla de reacción de la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos (Figura 19) previamente descrita y que se venía usando en el CNM para realizar el diagnóstico de infecciones por el RUBV. Así, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-9} de los ARNs extraídos a partir de la vacuna del RUBV, de una muestra clínica positiva para MeV y de una muestra clínica positiva para B19V. Estos extractos se probaron en paralelo en la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos modificada con betaína y sin modificar. Se pudo percibir que la sensibilidad para RUBV aumentó en 4 logaritmos con la introducción de la betaína 5 M (Figura 19). También, se vio que la intensidad de las bandas amplificadas para el MeV y especialmente para el B19V aumentaron (Figura 19).

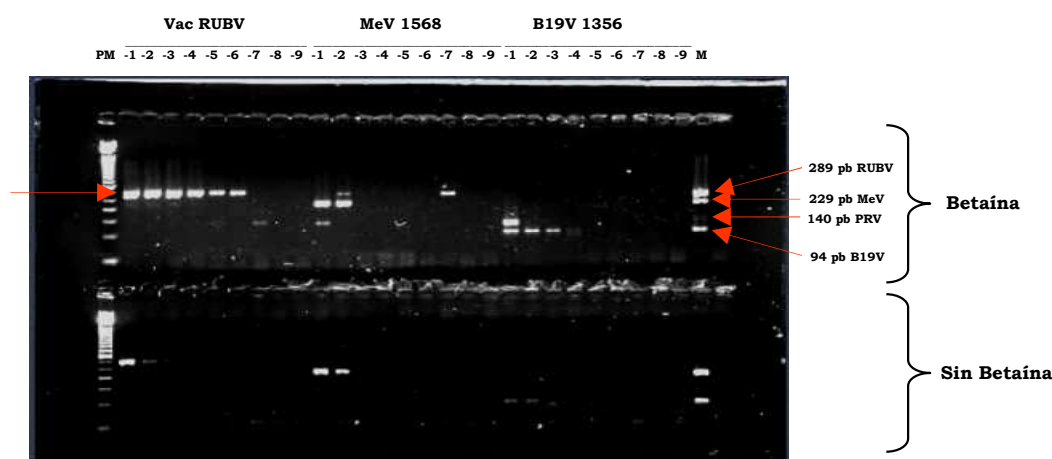


Figura 19: RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos modificada con betaína 5M y sin modificar. PM: marcador de peso molecular. M: marcador de peso molecular casero. 1: Vacuna de RUBV diluida de 10^{-1} a 10^{-9} ; 2: muestra clínica positiva para MeV 1568 diluida de 10^{-1} a 10^{-9} ; 3: muestra clínica positiva para B19V diluida 10^{-1} a 10^{-9} ; PRV: control interno del virus de la Pseudorabia.

3. ESTIMACIÓN DE LA MEJORA DE LA SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA RT-PCR ANIDADA MÚLTIPLE PARA VIRUS EXANTEMÁTICOS MODIFICADA CON MUESTRAS DEL BROTE DE RUBÉOLA DE MADRID 2004/2005.

Los resultados obtenidos con 75 casos de un brote de rubéola, se compararon con los de un estudio anterior realizado con muestras del mismo brote analizadas con la técnica sin modificar con betaína (122).

De los 75 casos investigados, 58 (77,3%) resultaron positivos a rubéola por alguna de las aproximaciones diagnósticas. Tres (5,2%) casos positivos fueron diagnosticados sólo por serología, 16 (27,6%) sólo por RT-PCR y 39 (67,2%) por ambos tipos de técnicas (Figura 21). En el estudio original con la técnica sin modificar se obtuvieron un 71% de casos positivos de los que el 42,9% fueron diagnosticados solo por serología, el 23,8% solo por RT-PCR y tan solo el 33,3% por ambas técnicas (Figura 20). Es, pues, clara la mejora de la modificación que permitió pasar de un 57,1% de casos con RT-PCR positiva a un 94,8%. Sin embargo, al acumularse este incremento de manera muy significativa en los casos con IgM positiva, no se tradujo en un aumento tan espectacular del número de casos positivos (tan solo un 6%) cuando se consideran los resultados de ambas técnicas en conjunto. Se obtuvo amplificación en el exudado faríngeo de los 55 casos positivos por RT-PCR, mientras que tan solo 32 fueron positivos en suero y 30 en orina (tabla 9). En 16 casos, la RT-PCR en exudado faríngeo fue la única prueba genómica positiva. Empleando la detección de IgM y del virus en faringe se diagnosticaron 58 casos.

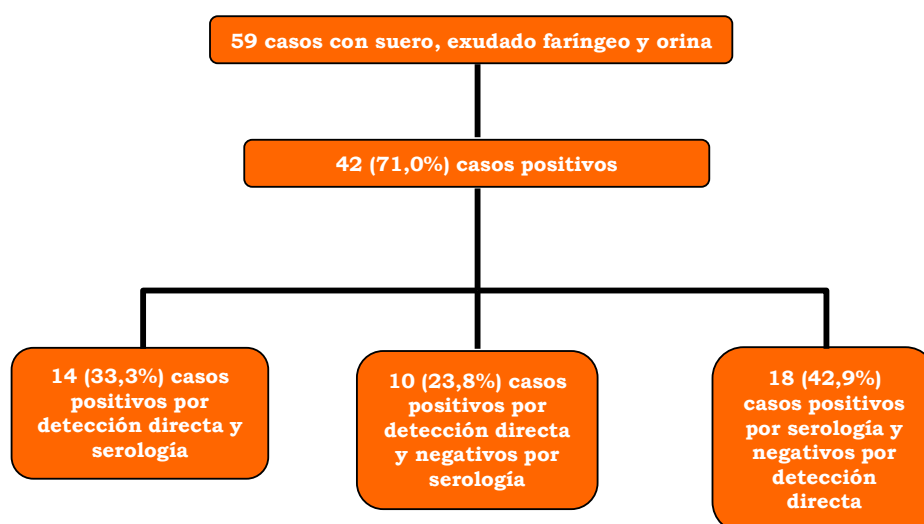


Figura 20: Esquema de resultados obtenidos en el brote de la CAM con la RT-PCR anidada múltiple sin betaína (122).

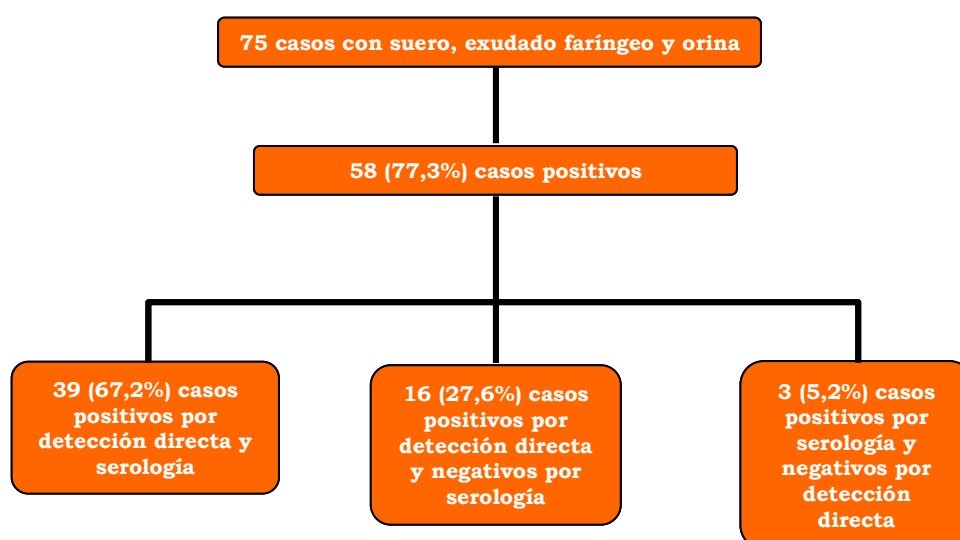


Figura 21: Esquema de resultados obtenidos en el brote de la CAM con la RT-PCR anidada múltiple modificada con betaína.

Atendiendo al rendimiento obtenido con cada tipo de muestra, la RT-PCR anidada múltiple modificada con betaína, permitió detectar un 42,4% más de casos positivos en exudado faríngeo, un 24,2% más en suero y un 37,4% más en orina, que con la técnica no modificada (Tabla 9). Con estos resultados validamos la modificación que se le hizo a esta técnica, viéndose una mayor sensibilidad en muestras del mismo brote evaluado inicialmente por Mosquera *et al.* (2006) (122) sin la modificación.

Con esta técnica mejorada se volvieron a ensayar los líquidos amnióticos descritos en el apartado 1.6 que habían dado resultado negativo con la técnica original.

Tabla 9. Rendimiento de los diferentes marcadores en el diagnóstico del virus de la rubéola con la RT-PCR anidada múltiple con betaína y sin betaína [124]. En cada caso se dispuso de tres tipos de muestras.

<i>Resultados</i>	<i>IgM</i>		<i>RT-PCR en Exudado Faríngeo</i>		<i>RT-PCR en Suero</i>		<i>RT-PCR en Orina</i>	
	B	N	B	N	B	N	B	N
Positivos	42(72,4%)	32(76,2%)	55(94,8%)	22(52,4%)	32(55,2%)	13(31%)	30(51,7%)	6(14,3%)
Equívocos	6(10,4%)	5(11,9%)	—	—	—	—	—	—
Negativos	10(17,2%)	5(11,9%)	3(5,2%)	20(47,6%)	26(44,8%)	29(69,0%)	28(48,3%)	36(85,7%)

B: con betaína; N: sin betaína.

4. DESARROLLO DE UNA RT-PCR ANIDADA PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA RUBÉOLA.

4.1 Diseño de los iniciadores

Los oligonucleótidos fueron diseñados para cubrir la ventana de 739 nt del gen E1 recomendada por la OMS (nt 8731-9469 según secuencia de nt de la cepa vacunal RA27/3 con código de acceso de GenBank L78917) (193). Esta secuencia codifica para los aa 159-404 del gen E1. Se tomaron todas las secuencias genómicas de la glicoproteína E1 disponibles en la base de datos GenBank (septiembre 2007) y se alinearon usando el método Clustal W disponible en los programas BioEdit 7.0.9 (79) y MEGA v. 4.0 (167). El oligonucleótido en sentido positivo de la primera reacción y los dos oligonucleótidos de la reacción anidada fueron modificados a partir de las secuencias de los oligonucleótidos cedidos por el Dr. Joe Icenogle (Jefe del Laboratorio de Rubéola del Centro para el Control de Enfermedades-CDC), mientras que el oligonucleótido anti-sentido de la primera reacción fue

diseñado por nosotros, tras comprobar que el que se nos proponía contenía algunos desapareamientos cercanos al extremo 3'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por una casa comercial (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). Los criterios para el diseño de los iniciadores fueron los siguientes:

1. El tamaño debía ser de entre 18 y 22 nt, preferentemente 20.
2. Las posiciones degeneradas no podían corresponder al extremo 3' o posiciones adyacentes.
3. La base del extremo 3' no debía situarse en la tercera posición del codón.
4. La temperatura de hibridación de cada iniciador debía ser similar.

1º Reacción

GRUB739F1 (8657-8675)	GRUBR1 (9574-9557)
GRUB739F1: 5'-CCCACCGACACCGTGATGA-3'	GRUBR1: 5'-CCAGGTCTGCCGGGTCTC-3'
169: 5'-CCCACCGACACCGTGATGA-3'	Alinm: 5'-GAGACCCGGCAGACCTGG-3'
1: 5'-...T...-3'	164: 5'-GAGACCCGGCAGACCTGG-3'
1: 5'-...T...-3'	1: 5'-...G...-3'
1: 5'-...T...-3'	2: 5'-...T...-3'
13: 5'-...T...-3'	1: 5'-...A...-3'
1: 5'-...G...-3'	
1: 5'-...C...-3'	

2º Reacción

GRUB739F2 (8669-8687)	GRUB765 (9549-9533)
GRUB739F2: 5'-GTGATGAGCGTGTTTCGCCC-3'	GRUB765: 5'-GGCACACACACCAITGC-3'
169: 5'-GTGATGAGCGTGTTTCGCCC-3'	Alinm: 5'-GGCACACACACCAITGC-3'
1: 5'-...C...-3'	164: 5'-GGCACACACACCAITGC-3'
12: 5'-...T...-3'	22: 5'-...C...-3'
1: 5'-...C...-3'	5: 5'-...A...-3'
4: 5'-...T...-3'	

Figura. 22. Oligonucleótidos para amplificación de rubéola. La posición de cada oligonucleótido es dada siguiendo la secuencia de referencia L78917 [Rvi/PA.USA/64VAC[1a] (RA27/3)]. El tamaño de la banda obtenida con la primera reacción es de 926 pb y para la reacción anidada es de 875 pb. Las secuencias usadas en los alineamientos fueron tomadas de la base de datos GenBank el 25 de septiembre de 2007. El número de secuencias que son iguales a las secuencias de nuestros oligonucleótidos se muestra a la izquierda de cada oligonucleótido ilustrado.

4.2 Ajuste de parámetros de primera reacción de PCR.

Se usó el sistema comercial Access RT-PCR de Promega (Madison, WI, EEUU) para realizar una reacción de transcripción inversa y amplificación en un sólo paso. Inicialmente se tituló en unas condiciones tentativas la cepa vacunal del RUBV indicada en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos, para establecer una dilución de trabajo baja con la que evaluar efectos sobre la sensibilidad y otra alta con la que observar posibles efectos sobre la aparición de bandas inespecíficas múltiples. Así, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando ambas diluciones, 10^{-1} y 10^{-3} , para establecer las concentraciones óptimas de SO_4Mg (Figuras 23 y 24), desoxinucleótidos trifosfato e iniciadores (Figura 25), así como las temperaturas óptimas de hibridación (Figura 26) y de desnaturalización (Figura 27).

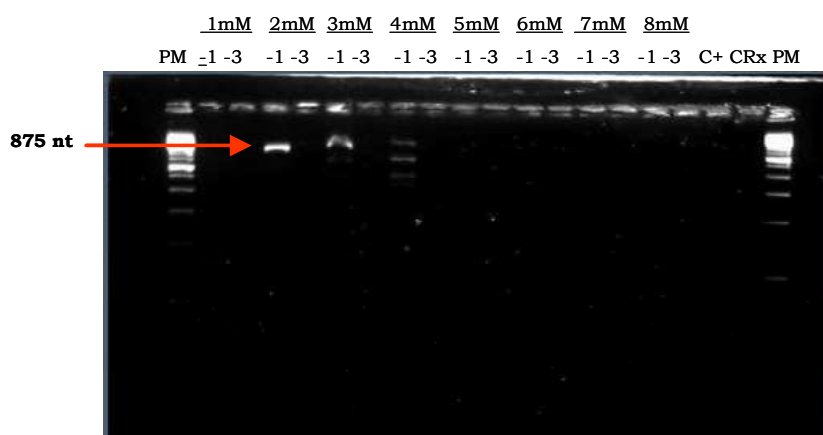


Figura 23: Experimento de estandarización de la concentración de SO_4Mg para RUBV. PM: Marcador de peso molecular. -1: Vacuna de RUBV a 10^{-1} . -3: Vacuna de RUBV a 10^{-3} . 1 a 8 mM: concentraciones de SO_4Mg probadas.

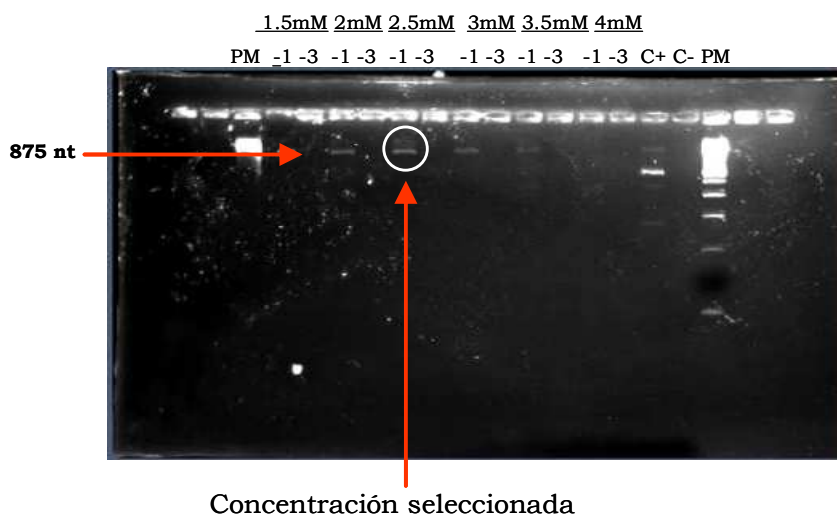


Figura 24: Experimento de estandarización de la concentración de SO_4Mg para RUBV. PM: Marcador de peso molecular. -1: Vacuna de RUBV a 10^{-1} . -3: Vacuna de RUBV a 10^{-3} . 1.5 a 4 mM: concentraciones de SO_4Mg probadas.

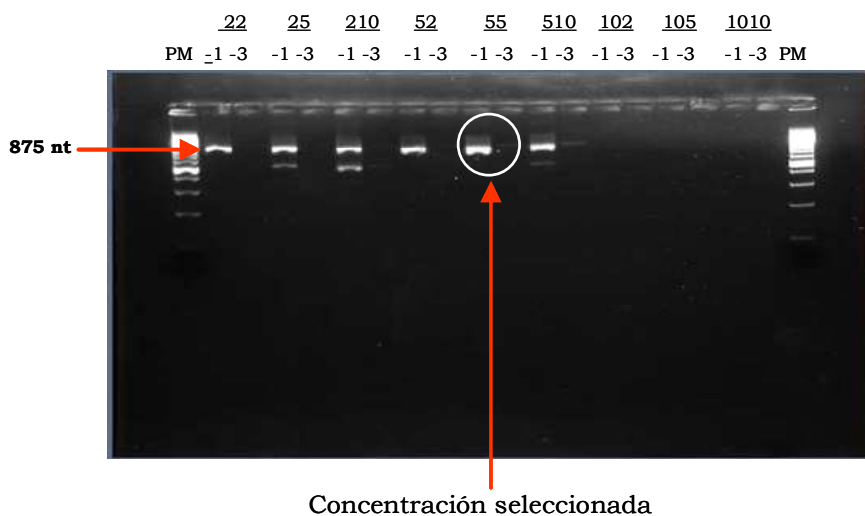


Figura 25: Estandarización combinada de la concentración de iniciadores y dNTPs para el genotipado de RUBV. 22: dilución de 200 μM dNTPs y 0.2 μM de iniciadores; 25: dilución de 200 μM dNTPs y 0.5 μM de iniciadores; 210: dilución de 200 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores; 52: dilución de 500 μM dNTPs y 0.2 μM de iniciadores; 55: dilución de 500 μM dNTPs y 0.5 μM de iniciadores y 510: dilución de 500 μM dNTPs y 1 μM de iniciadores; 102: 1 mM de dNTPs y 0.2 μM de iniciadores; 105: 1 mM de dNTPs y 0.5 μM de iniciadores; 1010: 1 mM de dNTPs y 1 μM de iniciadores. -1: Vacuna de RUBV a 10^{-1} . -3: Vacuna de RUBV a 10^{-3} . PM: Marcador de peso molecular.

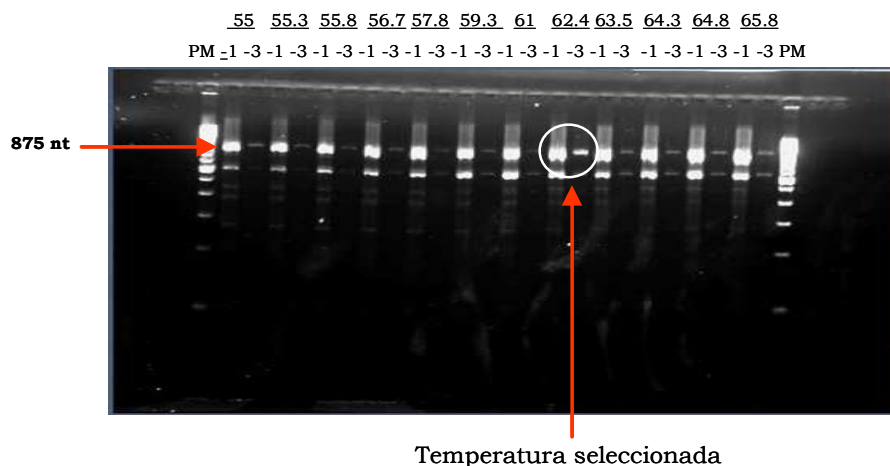


Figura 26: Estandarización de la temperatura de hibridación de genotipado de RUBV. PM: marcador de peso molecular. Temperaturas de hibridación de 55°C a 65.8°C. -1: dilución 10^{-1} de la vacuna de RUBV. -3: dilución 10^{-3} de la vacuna de RUBV.

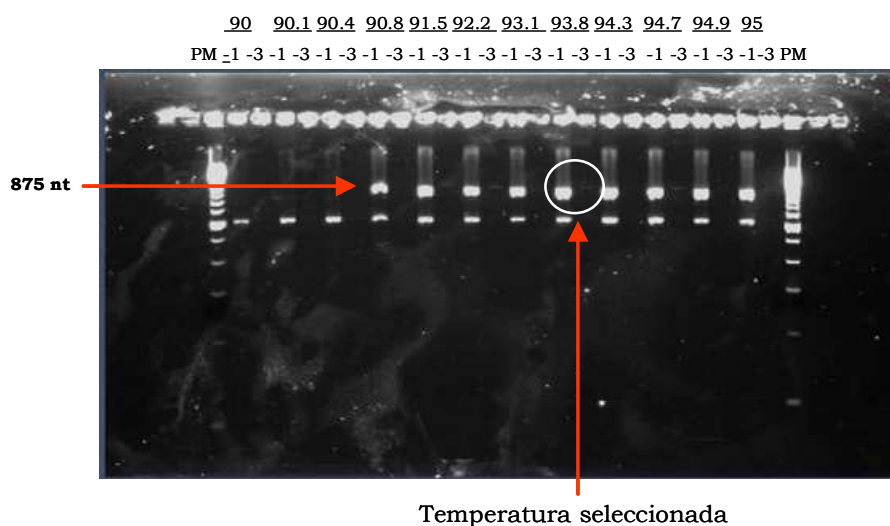


Figura 27: Estandarización de la temperatura de desnaturalización de genotipado de RUBV. PM: marcador de peso molecular. Temperaturas de desnaturalización de 90°C a 95°C. -1: dilución 10^{-1} de la vacuna de RUBV. -3: dilución 10^{-3} de la vacuna de RUBV.

En base a estos experimentos se seleccionaron las condiciones óptimas de la primera reacción de PCR: 5 μ l del extracto obtenido de la muestra a estudiar se mezclaron con 2,5 mM de $MgSO_4$, 500 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP), 0,5 μ M de los oligonucleótidos específicos para la primera reacción (Figura 22), 10 μ l del tampón AMV/Tfl 5x, 5 U de la retrotranscriptasa del virus de la

mieloblastosis aviar, 10 μ l de betaina 5 M (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania), y 5 U de la polimerasa de ADN *Thermus flavus* y ajustado con H₂O libre de nucleasa hasta conseguir un volumen final de 50 μ l. Se utilizó un termociclador Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EEUU) en el cual se estandarizaron también las temperaturas de la primera reacción de PCR. Se obtuvo así el siguiente programa óptimo: 45 min a 48°C para la transcripción inversa y 2 min a 94°C para inactivar la transcriptasa inversa y desnaturalizar el ADN complementario (ADNc), seguido de 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de hibridación a 62°C y 1 min de elongación a 72°C. La elongación se extendió 5 min en el último ciclo (110).

4.3 Ajuste de parámetros de segunda reacción de PCR o “nested”.

Las condiciones de segunda reacción se obtuvieron realizando experimentos de estandarización similares a los de la primera reacción (Figuras 28 a 33).

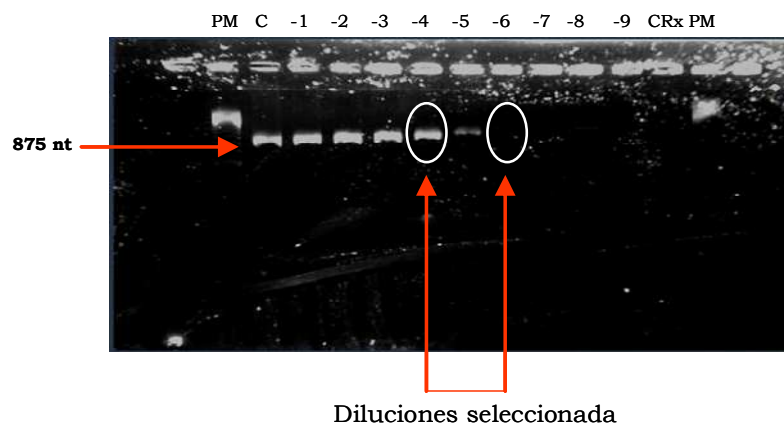


Figura 28: Curva de diluciones de la vacuna de RUBV para seleccionar las diluciones de trabajo para la estandarización de las condiciones de la 2ª reacción para el genotipado del RUBV. PM: marcador de peso molecular. C: Vacuna de RUBV concentrada. -1 a -9: dilución 10^{-1} a 10^{-9} de la vacuna de RUBV. CRx: control de reactivos.

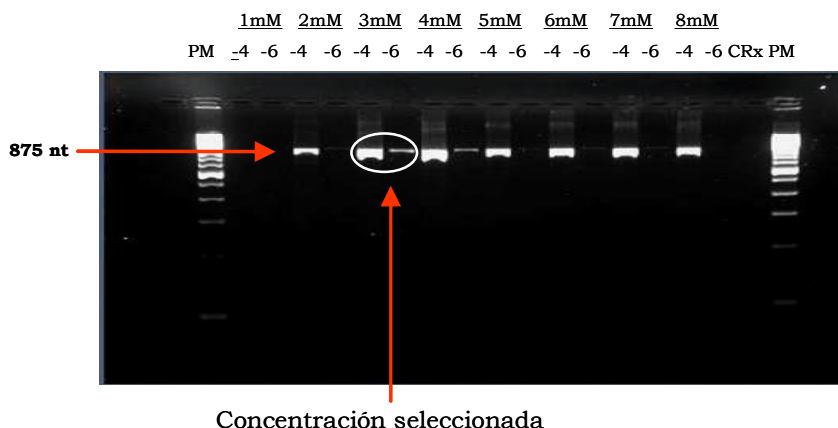


Figura 29: Experimento de estandarización de la concentración de Cl_2Mg para la 2ª reacción del genotipado del RUBV. PM: Marcador de peso molecular. -4: dilución 10^{-4} de la vacuna de RUBV. -6: dilución 10^{-6} de la vacuna de RUBV. 1 a 8 mM: concentraciones de Cl_2Mg probadas.

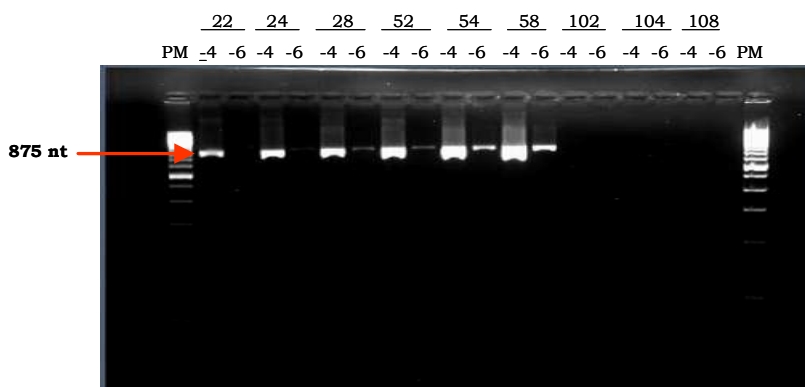


Figura 30: Estandarización combinada de la concentración de iniciadores y dNTPs para la 2ª reacción del genotipado de RUBV. 22: dilución de 200 μM dNTPs y 0.2 μM de iniciadores; 24: dilución de 200 μM dNTPs y 0.4 μM de iniciadores; 28: dilución de 200 μM dNTPs y 0.8 μM de iniciadores; 52: dilución de 500 μM dNTPs y 0.2 μM de iniciadores; 54: dilución de 500 μM dNTPs y 0.4 μM de iniciadores; 58: dilución de 500 μM dNTPs y 0.8 μM de iniciadores; 102: 1 mM de dNTPs y 0.2 μM de iniciadores; 104: 1 mM de dNTPs y 0.4 μM de iniciadores; 108: 1 mM de dNTPs y 0.8 μM de iniciadores. -4: dilución 10^{-4} de la vacuna de RUBV. -6: dilución 10^{-6} de la vacuna de RUBV. PM: Marcador de peso molecular.

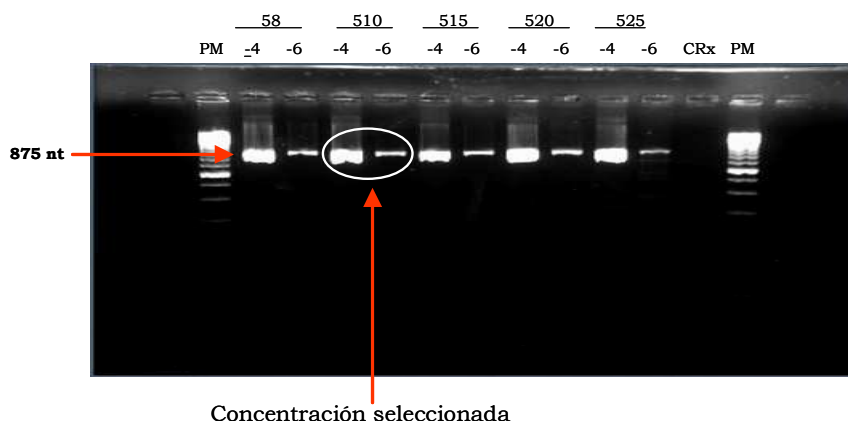


Figura 31: Estandarización combinada de la concentración de iniciadores y dNTPs para la 2ª reacción del genotipado de RUBV. 58: dilución de 500 μ M dNTPs y 0.8 μ M de iniciadores; 510: dilución de 500 μ M dNTPs y 1.0 μ M de iniciadores; 515: dilución de 500 μ M dNTPs y 1.5 μ M de iniciadores; 520: dilución de 500 μ M dNTPs y 2.0 μ M de iniciadores; 525: dilución de 500 μ M dNTPs y 2.5 μ M de iniciadores. -4: dilución 10^{-4} de la vacuna de RUBV. -6: dilución 10^{-6} de la vacuna de RUBV. PM: marcador de peso molecular.

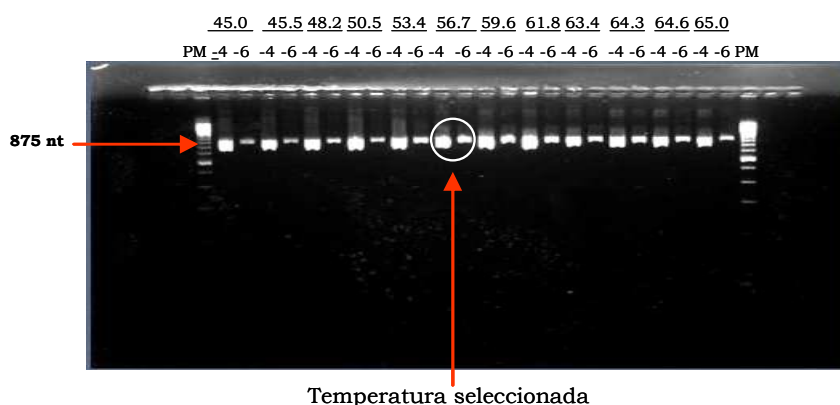


Figura 32: Estandarización de la temperatura de hibridación de la 2ª reacción para el genotipado de RUBV. PM: marcador de peso molecular. Temperaturas de hibridación de 45°C a 65°C. -4: dilución 10^{-4} de la vacuna de RUBV. -6: dilución 10^{-6} de la vacuna de RUBV.

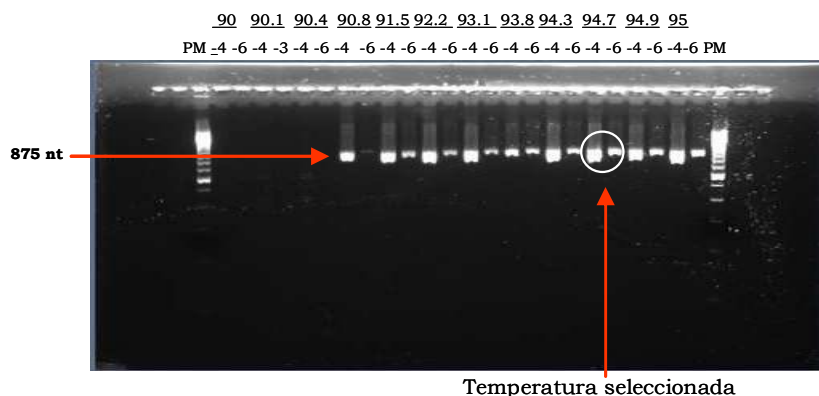


Figura 33: Estandarización de la temperatura de desnaturalización de la 2ª reacción para el genotipado del RUBV. PM: marcador de peso molecular. Temperaturas de desnaturalización de 90°C a 95°C. -4: dilución 10^{-4} de la vacuna de RUBV. -6: dilución 10^{-6} de la vacuna de RUBV.

En la segunda reacción de la PCR para el genotipado del RUBV se añadió 1 µl del producto de la amplificación de la primera reacción a 49 µl de una nueva mezcla. En base a experimentos similares a los de la primera reacción se seleccionaron las condiciones óptimas de la segunda reacción de PCR o “Nested”: 3 mM de MgCl₂, 500 µM de cada uno de los desoxinucleóticos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP), 1 µM de los oligonucleótidos de segunda reacción (Figura 22), 5 µl del tampón PCR II 10x (Applied Biosystems, CA, USA), 10 µl de betaína 5 M (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) y 0,25 U de la *Taq* ADN polimerasa (Applied Biosystems, CA, EEUU). En el termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research, Watertown, MA, EEUU) se realizó la amplificación según el siguiente programa: 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94,7°C, 1 min de hibridación a 57°C, y 1 min de elongación a 72°C. La elongación también se prolongó a 5 min en el último ciclo (110).

Se visualizaron los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0,5 µg de bromuro de etidio por ml en tampón Tris-borato-EDTA bajo luz ultravioleta. El tamaño de la banda esperada fue 875 pb (110).

4.4 Ensayo de coadyuvantes para mejora de la sensibilidad.

El genoma del RUBV es rico en GC (69,5%) (40, 70, 105), lo cual hace difícil la retrotranscripción y la amplificación (35). Es conocido que algunos adyuvantes como la betaína, el DMSO o la glicerina reducen la formación de estructuras secundarias en regiones ricas de GC tanto en el ARN como en el ADN, permitiendo un mejor acceso a la retrotranscriptasa y a la ADN polimerasa a la secuencia molde (82, 84). Por esta razón, decidimos probar estos adyuvantes en nuestro método.

Al probar la detección de dilución 10⁻¹ de RUBV con betaína 5 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU), diferentes combinaciones de DMSO con βME, y diferentes concentraciones de DMSO con diferentes concentraciones de Glicerol (Figura 34), se encontró que las combinaciones que mejor funcionaron fueron la betaína 5 M, 5% DMSO con 0,02% de βME y 10% DMSO con 0,02% de βME (Figura 35), por lo que se escogieron para hacer

una nueva comparación mediante una curva de diluciones de RUBV. En esta curva de diluciones (10^{-1} a 10^{-9}), se vio que con la betaína 5M se obtuvo la mejor sensibilidad (Figura 35).

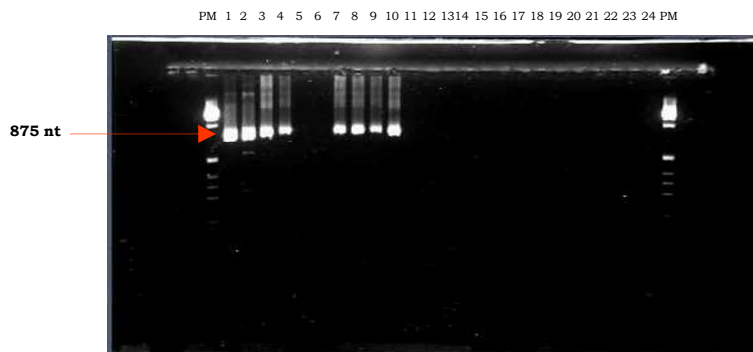


Figura 34: Prueba de estandarización con Betaína, DMSO-βME y DMSO-Glicerol. PM: marcador de peso molecular, 1: Vac RUBV 10^{-1} + Betaína; 2: Cepa de RUBV 250 + Betaína; 3 a 6: + 5%, 10%, 15% o 20% DMSO + 2×10^{-4} βME; 7 a 10: + 10% DMSO + 2×10^{-4} , 6×10^{-4} , 1×10^{-3} o 2×10^{-3} βME; 11 a 14: + 5%, 10%, 15% o 20% DMSO + 5% Glicerol; 15 a 18: + 5%, 10%, 15% o 20% DMSO + 10% Glicerol; 19 a 22: + 5%, 10%, 15% o 20% DMSO + 15% Glicerol; 23 a 24: + 5% o 10% DMSO + 20% Glicerol.

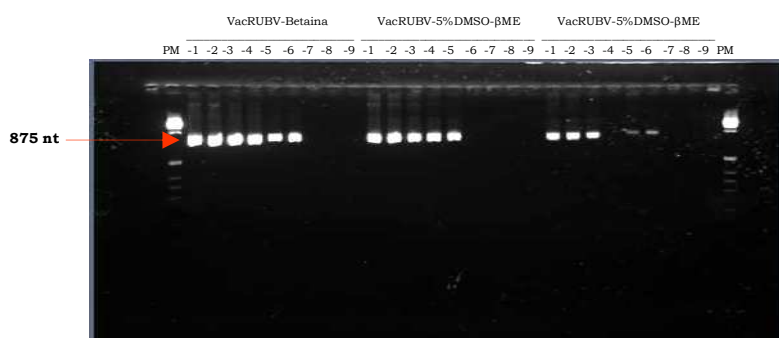


Figura 35: Prueba de sensibilidad con Betaína y DMSO-βME. PM: marcador de peso molecular. 1 a 9: Vac RUBV 10^{-1} a 10^{-9} + Betaína 5M. 2: 10 a 18: + 5% DMSO - 2×10^{-4} βME. 3: 19 a 27: + 10% DMSO - 2×10^{-4} βME.

4.5 Evaluación de especificidad y de sensibilidad comparativa con aislamiento en cultivos.

A partir de la cepa vacunal RA27/3 de RUBV (Beecham, Madrid, España) se obtuvieron bandas de ADN de la longitud esperada para RUBV (Figura 35), y no se observó amplificación cruzada con los demás virus utilizados (parainfluenza 1, 2, 3, 4A y 4B; AdV 5; virus de la parotiditis; virus

respiratorio sincitial A y B y virus de la encefalitis equina del este) (datos no mostrados).

Se ensayaron en paralelo por aislamiento en cultivo y RT-PCR de genotipado 40 muestras positivas para RUBV por RT-PCR múltiple del brote de rubéola de la CAM en 2004/2005. Se pudieron aislar 16 virus a partir de exudados faríngeos y otros dos desde orina (45%) (Figura 36). Las 40 muestras fueron positivas por RT-PCR de genotipado (110). Esto refleja una mayor sensibilidad de las técnicas de RT-PCR en comparación con el aislamiento viral. Aunque es cierto que medió un ciclo de congelación entre la RT-PCR múltiple y el aislamiento, esto ocurrió también con la RT-PCR de genotipado sin merma en la sensibilidad. Se designó estos aislamientos según las normas de la OMS para nombrar las cepas del RUBV (193). Las secuencias del fragmento de RT-PCR de genotipado obtenidas de los aislamientos fueron idénticas a las de las muestras originales (datos no mostrados).

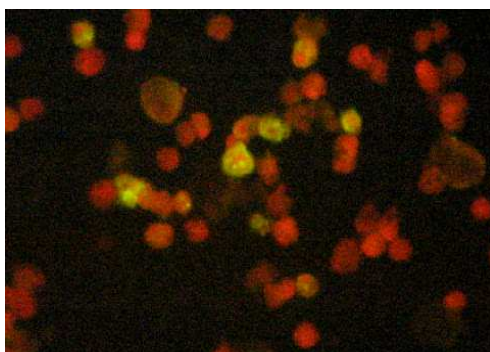


Figura 36. Inmunofluorescencia de una de las cepas aisladas del brote de Madrid, 2004/2005.

4.6 Resultados obtenidos con la RT-PCR de genotipado con las muestras clínicas retrospectivas y prospectivas del CNM.

A partir de 150 muestras clínicas provenientes de 150 casos descritas en el apartado 1.4 de materiales y métodos, se obtuvieron 81 amplificaciones positivas con la RT-PCR de genotipado y de éstas, se genotiparon 75 que incluyen las de los brotes de RUBV de Madrid 2004/2005 y de Algeciras 2008 (apartado 1.2 y 1.3 de materiales y métodos, respectivamente) (Tabla 10). De las 369 muestras del apartado 1.5 de sueros de archivo de la colección del ISCIII y de las 65 muestras de líquido amniótico del apartado 1.6

de materiales y métodos, no se logró ninguna amplificación, obteniéndose un resultado negativo en todas estas amplificaciones.

Tabla 10. Resultados de las amplificaciones con la RT-PCR de genotipado de muestras clínicas retrospectivas y prospectivas del CNM.

Muestra	RT-PCR genot
Ex faríngeo	57/71
Suero	8/46
Orina	9/21
LCR	2/5
L. Amniótico	0/1
Sangre	3/4
Saliva	2/2

5. GENOTIPOS DE RUBV ENCONTRADOS EN ESPAÑA, 1998-2009.

Primeramente se analizaron cada una de las secuencias obtenidas desde 1998 a 2009 junto con las de referencia de la OMS (195), para determinar a que genotipo pertenecían (Figura 37). En segundo lugar, se genotipificó cada secuencia encontrada en la base de datos GenBank (actualizadas hasta el 4-4-2012) sin asignación a genotipo, siguiendo el mismo método (datos no mostrados) y, finalmente, se hicieron árboles individuales de cada uno de los genotipos detectados en España con la totalidad de las secuencias de GenBank que fueron clasificadas como pertenecientes al mismo genotipo y las generadas en este estudio (Figura 37 a la Figura 47).

Durante el período de tiempo del estudio, se han genotipado 75 muestras, detectándose cinco genotipos diferentes en forma de casos esporádicos o de brotes, sin que exista en ningún momento un único genotipo predominante (Tabla 11; Figura 37). Se puede observar que el genotipo 1E fue detectado en 1998 (Canarias) y 2003 (Brote en Madrid) (153), siendo el único que circuló en España en este periodo, y no volvió a producir otro caso esporádico, hasta el 2009 (Málaga, Andalucía). Por otro lado, se muestra la detección intermitente en casos esporádicos del genotipo 2B en el año 2004 en El Ejido, Almería (Andalucía) y en el 2006 en Madrid, hasta la aparición en un

brote en Algeciras, Cádiz (Andalucía) en el 2008, con casos esporádicos derivados en la Comunidad de Madrid, la Ciudad Autónoma de Ceuta y la Comunidad Valenciana. Sin embargo, el genotipo provisional 1j, causó un gran brote en Madrid de aproximadamente 460 casos entre el 2004 y 2005, afectando mayoritariamente a la comunidad latinoamericana (1, 110, 122) con un caso esporádico derivado en Sevilla, y posteriormente, se observó en el 2007 un caso esporádico en Barcelona. Por otra parte, se encontró en el 2008 en Guadalajara un caso clínico neurológico producido por el genotipo provisional 1i, sin observarse este genotipo antes o después de su aparición. Además, se detectaron en el 2009 en Madrid, tres casos asociados al genotipo 1a, los cuales cuentan con una secuencia muy parecida a la secuencia de la vacuna de RUBV RA27/3 (L78917) e idéntica a la secuencia vacunal 1a (RA27/3) utilizada en España. A resaltar, que dos de estos casos eran individuos inmunodeprimidos.

Tabla 11: Genotipos de RUBV encontrados en España en el periodo de 1998-2009.

CCAA	1998	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Andalucía, Algeciras							2B	
Andalucía, Almería			2B					
Andalucía, Málaga								1E
Andalucía, Sevilla				1j				
Islas Canarias	1E							
Castilla y la Mancha							1i	
Cataluña, Barcelona						1j		
Ciudad Autónoma de Ceuta							2B	
Madrid		1E	1j	1j	2B		2B	1a
Comunidad Valenciana							2B	

En rojo, se señalan los genotipos de los brotes y en azul, los de casos esporádicos.

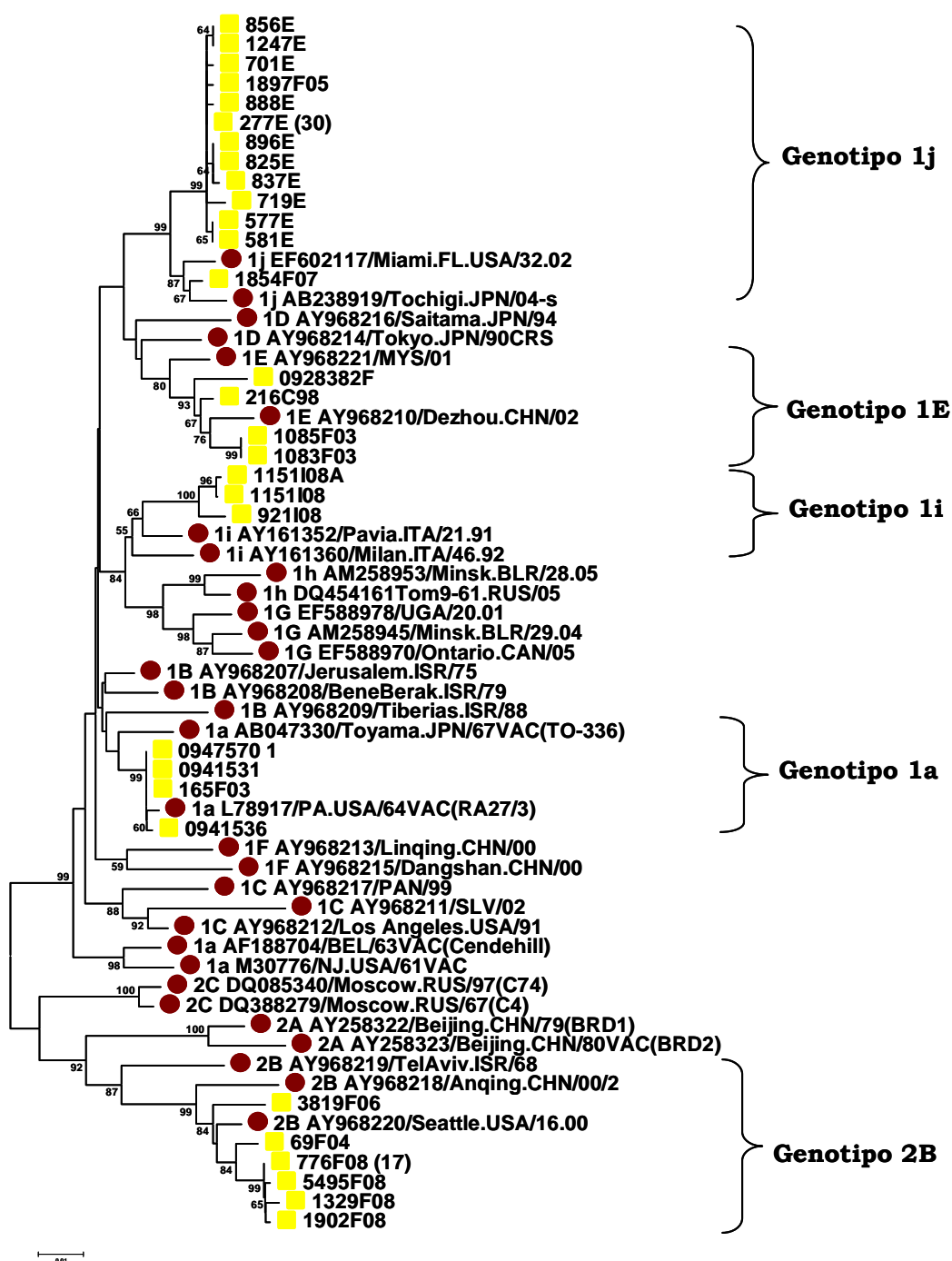


Figura 37. Árbol filogenético con el método de *Neighbor-Joining* de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. En este se señalan los genotipos españoles (■) que circularon entre el periodo 1998 a 2009 y todas las secuencias de referencia aceptadas, también como las secuencias de los tres genotipos provisionales 1h, 1i y 1j (●). En la figura solo se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 49.

5.1 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1j.

La mayoría de las secuencias de este genotipo, pertenecen a un mismo brote ocurrido en Madrid entre el 2004/2005 (Tabla 12; Figuras 38 y 39). La homología observada entre todas las secuencias del brote y las cepas de referencia presenta un rango comprendido entre 97,8% a 98,2% para el 1j, y de 89,5% (2A) a 96,7% (1B) para los otros genotipos (Tabla 12). Todas las secuencias del brote formaron un grupo bien soportado en el árbol filogenético de distancias (Figura 37) y se agruparon con las cepas de referencia 1j con un valor de *bootstrap* significativo de 99. Todos estos resultados permiten que las cepas causantes del brote sean asignadas al genotipo 1j.

Las secuencias encontradas en GenBank que aparecen relacionadas de manera más significativa con las de este brote corresponden a tres secuencias de Brasil (CQ329848/RioGrandedoSul.BRA/48.05), del mismo año 2005 en el que se desarrolló el brote, el cual incidió mayoritariamente en la población latinoamericana de la Comunidad de Madrid (Figuras 38 y 39; Tabla 12). Una de las secuencias del brote presentaba identidad total con estas tres secuencias. Sin embargo, la fecha en la que se detectaron, semana 48, es posterior a la finalización oficial del brote. Este mismo año se encontró una secuencia esporádica similar a las del brote, la 1897F05, perteneciente a un hombre de 26 años de Sevilla (Andalucía). Esta secuencia esporádica, presentó una sola variación nucleotídica con respecto a las del brote, en la posición 615, que afectó la posición 2 del codón y produjo un cambio de aa, P206L (Tabla 13). Dos años después, se detectó otra secuencia 1j, la 1854F07, perteneciente a un hombre de 22 años de Barcelona (Cataluña), situada en una rama diferente que comparte con dos secuencias a las que se asocia de forma significativa (Figuras 38 y 39). Con una de ellas, que circuló en el año 2010 en Hong Kong (HM461998/Hong Kong.CHN/18.10) la homología fue del 99,6%, mientras que con la otra, que circuló en el 2011 en Canadá (JN575762/BritishColumbia.CAN/25.11.) fue del 99,2%. A la vista de estos resultados y de los datos epidemiológicos, el origen más probable de las cepas del brote de Madrid sería Latinoamérica, ya que coincidirían tanto el origen de la población más afectada como el de

la secuencia más parecida. Se necesitarían más datos de circulación de RUBV en Latinoamérica para poder corroborar esta hipótesis. La cepa detectada en Sevilla en el mismo año parece relacionada con el brote, pero no así otra encontrada en Barcelona dos años después que parece tener su origen en un evento de importación diferente de origen desconocido.

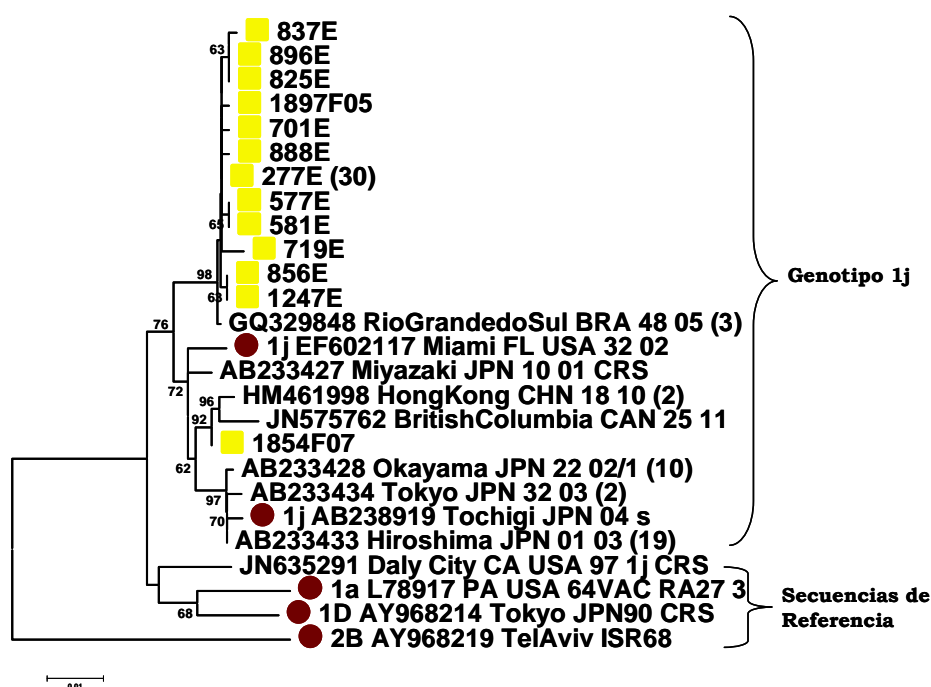


Figura 38. Árbol filogenético con el método de *Neighbor-Joining* de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Este muestra los aislamientos y las muestras del brote de RUBV en el 2004/2005 y dos secuencias esporádicas: 1897F05 del 2005 y 1854F07 del 2007 (■), y también, algunas secuencias de referencia, que representan a las diez secuencias aceptadas y a las tres secuencias de los genotipos provisionales 1h, 1i y 1j (●). Además, incluye otras secuencias del genotipo 1j. La secuencia 277E representa el 74.4% (30 de 40) de todos los aislamientos y muestras analizadas del brote. Los números dentro de los paréntesis representan el número de secuencias iguales. En la figura solo se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 49.

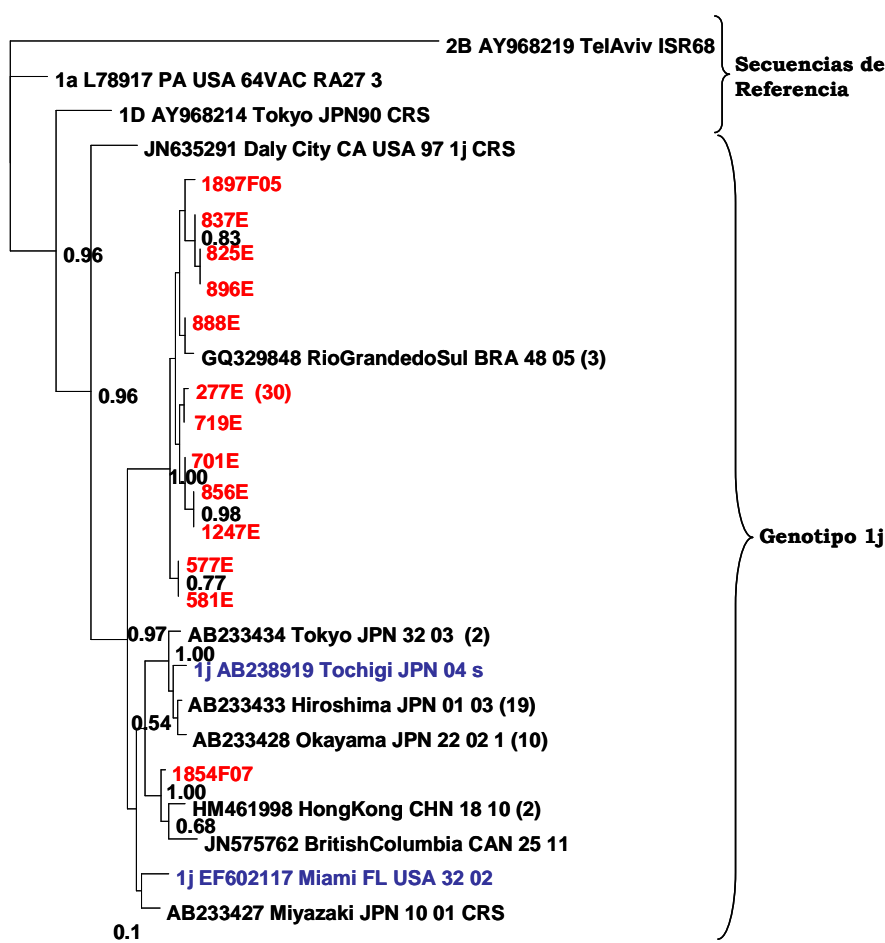


Figura 39. Árbol filogenético con la inferencia bayesiana de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Se señalan las muestras de España del genotipo 1j (color rojo), las secuencias de referencia del genotipo provisional 1j (color azul) y algunas secuencias de referencia aceptadas y provisionales (color negro). Además, se incluye otras secuencias del genotipo 1j (color negro). Los números dentro de los paréntesis representan el número de secuencias iguales. En la figura solo se muestran los valores de "probabilidad posterior" mayores de 0,49.

Tabla 12. Porcentaje de homología de la ventana de 739 nts del gen E1 recomendada por la OMS de todas las secuencias de genotipo 1j encontradas en el estudio, de las secuencias más próximas a las mismas encontradas en GenBank y de las secuencias de referencia de todos los genotipos utilizando el método MegAlign del programa Lasergene 7.0.

Secuencias	1897F05	1854F07	277E(30)	577E	581E	701E	719E	825E	837E	856E	888E	896E	1247E
1j_EF602117	98.0	98.8	98.2	98.1	98.1	98.1	98	98.1	98	98.1	98.1	98.1	98.1
1j_AB238919	97.7	98.8	98.0	97.8	97.8	97.8	98	97.8	97.7	97.8	97.8	97.8	97.8
HM461998(2)	97.9	99.6	98.1	98.2	98.2	97.9	2.4	97.9	97.8	97.9	97.9	97.9	97.9
JN635291	97.1	97.4	97.2	97.1	97.1	97.1	3.2	97.1	96.9	97.1	97.1	97.1	97.1
AB233433(19)	98.1	99.2	98.2	98.1	98.1	98.1	98	98.1	97.9	98.1	98.1	98.1	98.1
GQ329848(3)	99.7	98.3	99.9	99.7	99.7	99.7	100	99.7	99.6	99.7	99.7	99.7	99.7
AB233427	98.3	99.2	98.5	98.4	98.4	98.4	98	98.4	98.2	98.4	98.4	98.4	98.4
AB233434(2)	97.8	98.9	97.9	97.8	97.8	97.8	98	97.8	97.7	97.8	97.8	97.8	97.8
AB233428(10)	97.9	99.0	98.1	97.9	97.9	97.9	98	97.9	97.8	97.9	97.9	97.9	97.9
JN575762	97.5	99.2	97.6	97.8	97.8	97.5	97	97.5	97.4	97.5	97.5	97.5	97.5
1a_L78917	95.9	96.7	95.9	95.8	95.8	95.8	96	95.8	95.6	95.8	95.8	95.8	95.8
1i_AY161360	95.3	95.6	95.5	95.4	95.4	95.4	95	95.4	95.2	95.4	95.4	95.4	95.4
1G_AM258945	94.6	94.6	94.8	94.6	94.6	94.6	94	94.6	94.5	94.6	94.6	94.6	94.6
1h_AM258953	94.0	93.9	94.0	93.9	93.9	93.9	94	94.2	94.0	93.9	93.9	94.2	93.9
1i_AY161352	95.6	95.6	95.8	95.7	95.7	95.7	95	95.7	95.5	95.7	95.7	95.7	95.7
1h_DQ454161	94.6	94.7	94.6	94.5	94.5	94.5	94	94.8	94.6	94.5	94.5	94.8	94.5
1G_EF588970	94.2	94.2	94.3	94.2	94.2	94.2	94	94.2	94.0	94.2	94.2	94.2	94.2
1G_EF588978	94.4	95.0	94.6	94.5	94.5	94.5	94	94.5	94.3	94.5	94.5	94.5	94.5
2C_DQ085340	92.5	92.3	92.7	92.8	92.8	92.5	92	92.8	92.7	92.5	92.5	92.8	92.5
2C_DQ388279	92.5	92.0	92.7	92.8	92.8	92.5	92	92.8	92.7	92.5	92.5	92.8	92.5
1a_AF188704	94.8	95.2	94.9	94.8	94.8	94.8	95	94.8	94.6	94.8	94.8	94.8	94.8
1a_M30776	94.6	94.8	94.8	94.6	94.6	94.6	94	94.6	94.5	94.6	94.9	5.4	94.6
1a_AB047330	95.6	96.5	95.8	95.6	95.6	95.7	95	95.6	95.5	95.7	95.6	95.6	95.7
2A_AY258322	91.0	90.3	91.0	91.1	91.1	90.8	91	91.1	91.0	90.8	90.8	91.1	90.8
2A_AY258323	89.7	89.7	89.7	89.8	89.8	89.5	90	89.8	89.7	89.5	89.8	89.8	89.5
1B_AY968207	96.7	96.9	96.8	96.7	96.7	96.7	96	96.7	96.5	96.7	96.7	96.7	96.7
1B_AY968208	96.2	96.5	96.4	96.2	96.2	96.2	96	96.2	96.1	96.2	96.2	96.2	96.2
1B_AY968209	95.0	95.6	95.2	95.1	95.1	95.1	95	95.1	94.9	95.1	95.1	95.1	95.1

1E_AY968210	95.0	95.5	95.2	95.1	95.1	95.1	95	95.1	94.9	95.1	95.1	95.1	95.1
1C_AY968211	92.5	92.8	92.6	92.5	92.5	92.5	92	92.8	92.7	92.5	92.5	92.8	92.5
1C_AY968212	95.4	95.9	95.5	95.4	95.4	95.4	95	95.4	95.2	95.4	95.4	95.4	95.4
1F_AY968213	95.0	95.3	95.2	95.0	95.0	95.1	95	95.0	94.9	95.1	95.0	95.0	95.1
1D_AY968214	96.2	96.5	96.4	96.5	96.5	96.2	96	96.2	96.1	96.2	96.2	96.2	96.2
1F_AY968215	94.0	94.6	94.2	94.0	94.0	94.0	94	94.0	93.9	94.0	94.3	94.0	94.0
1D_AY968216	95.8	95.5	94.1	95.8	95.8	95.8	96	95.8	95.6	95.8	95.8	95.8	95.8
1C_AY968217	94.2	94.5	94.3	94.2	94.2	94.2	94	94.5	94.3	94.2	94.2	5.5	94.2
2B_AY968218	90.4	90.4	90.5	90.7	90.7	90.4	90	90.7	90.5	90.4	90.4	90.7	90.4
2B_AY968219	91.6	91.6	91.8	91.6	91.6	91.6	92	91.6	91.5	91.9	91.6	91.6	91.9
2B_AY968220	91.1	91.1	91.3	91.5	91.5	91.2	92	91.2	90.0	91.2	91.2	91.2	91.2
1E_AY968221	96.1	96.2	96.2	96.1	96.1	96.1	96	96.1	95.9	96.1	96.1	96.1	96.1
Media	95.1	95.5	95.2	95.2	95.2	95.1	90.2	95.2	95.0	95.1	95.1	90.7	95.1
Rango	89.7 - 99.7	89.7 - 99.2	89.7 - 99.9	89.8 - 99.7	89.8 - 99.7	89.5 - 99.7	89.5 - 99.8	89.8 - 99.9	89.7 - 99.7	89.5 - 99.7	89.8 - 99.7	89.8 - 99.7	89.5 - 99.7

Dentro del brote se identificaron cuatro grupos y tres secuencias que no fueron clasificadas en ningún grupo (Tabla 13; Figuras 38 y 39). Los pacientes del grupo 4 (577A, 581E) vivían en el mismo área sanitaria, exhibieron los primeros síntomas en la misma semana, y tenían el mismo apellido materno (aunque no tenemos evidencias directas de que estuvieran relacionados). Las características epidemiológicas no permitieron establecer ninguna otra correlación significativa en los otros grupos.

Las secuencias en estudio mostraron 13 posiciones variables o sitios polimórficos con respecto a la cepa de referencia 1j (RVs/Miami.FL.USA/32.02[1j]), excepto la secuencia 701E, la cual no tiene la variación nucleotídica en la posición 304 del fragmento secuenciado, la cual está presente en todas las secuencias analizadas y causa un cambio de aa, L181S. La secuencia 277E representa a 30 de las 40 (75,0%) secuencias analizadas (Tabla 13; Figuras 38 y 39), las cuales forman el grupo 1. Esta cepa parece ser la importada originalmente, ya que es la que estuvo presente en el primer caso detectado, sin que se observara ningún cambio hasta la semana epidemiológica 8 del 2005 (Tabla 13). Las dos secuencias de los casos de SRC también contenían esta cepa. El grupo 2 (secuencias 856E y 1247E) mostró una variación nucleotídica adicional en la posición 178 del fragmento secuenciado que afectó la tercera base del codón, permaneciendo silente. Mientras que el grupo 3 (secuencias 825E, 837E, y 896E) mostró una variación nucleotídica adicional en la posición 328 del fragmento secuenciado, la cual también permaneció silente, a diferencia de lo observado en la secuencia 837E, cuya variación nucleotídica adicional, en la posición 704 del fragmento secuenciado, afectó la primera base del codón, causando un cambio de aa, T236S. Este cambio está en una región inmunoreactiva (41, 73, 116, 171). El grupo 4 (577A y 581E) contiene una variación nucleotídica adicional en la posición 247 que no produce cambio de aa. Finalmente, las secuencias 701E, 719E y 888E mostraron variaciones nucleotídicas particulares, pero sólo la secuencia 701E mostró un cambio de aa, G95C. Este aa está también localizado en una región inmunoreactiva (41, 73, 116, 171). La otra secuencia esporádica 1854F07 de Barcelona,

presentó 8 cambios nucleotídicos con respecto a la secuencia de referencia 1j (EF6021179), que no produjeron cambios de aa (Tabla 12).

En resumen, 18 de 21 variaciones nucleotídicas (85,7%) observadas en el brote afectaron la posición 3 del codón y permanecieron silentes. De las otras tres variaciones no-sinónimas, dos afectaron la posición 2 y una la posición 1 del codón, produciendo cambios en la secuencia de aa.

Tabla 13. Diferencias en los nucleótidos y aminoácidos de los cuatros grupos y secuencias individuales comparadas con la secuencia de referencia RVs/Miami.FL.USA/32.02[1j] y la secuencia mayoritaria (277E) en la ventana de 739 nts del gen E1.

Grupos	Secuencias (secuencias iguales)	Números de accesos al GenBank	Cambios en los 739 nts del gen E1 con respecto al prototipo 1j EF602117			Cambios nucleotídicos (cambios de aminoácidos) en 739 nt del gen E1 RVs/Madrid.SPA/8.05/2[1j]*
			nt	Semanas	Cambios aa	
1	277E (30)	EU518607	13	49/2004	L181S ^a	
				a 13/2005		
2	856E	EU518614	14	10	L181S	C178G
	1247E	EU518606	14	13	L181S	C178G
3	825E	EU518612	14	10	L181S	C328T
	837E	EU518613	15	10	L181S	C328T, T703A(S394T)
					T236S ^a	
	896E	EU518616	14	10	L181S	C328T
4	577A	EU518608	14	8	L181S	C247T
	581E	EU518609	14	8	L181S	C247T
No agrupadas dentro del brote	701E	EU518610	13	9	G95C ^a	C281G(P253R)
					L181S	
	719E	EU518611	16	9	L181S	T82C, T307C, C433A
	888E	EU518615	14	10	L181S	T82C, T307C, C433A
	1897F05	—	14	20	L181S	
					P206L ^a	
No agrupadas fuera del brote	1854F07	—	8	15	—	

^a Cambios localizados en una región inmunorreactiva.

5.2 ANÁLISIS DE SECUENCIA DEL GENOTIPO 2B.

La homología observada entre 22 secuencias, entre las que se encuentran todas las del brote ocurrido en Algeciras en 2008 y las cepas de referencia presenta un rango comprendido entre 94,7 a 98,5% para el 2B, y de 88,5% (1F) a 93,3% (2C) para los otros genotipos (Tabla 14). Todas las secuencias del brote formaron un grupo bien soportado en el árbol de distancias (Figura 37) y se agruparon con las cepas de referencia 2B con un valor de *bootstrap* significativo de 99 con el análisis de *Neighbor-Joining*. Todos estos resultados permiten que estas 22 cepas sean asignadas al genotipo 2B.

Todas las secuencias 2B detectadas se engloban en un clado bien sustentado que engloba la mayoría de las secuencias del genotipo (Figuras 40 y 41). Las del brote de Algeciras 2008, representadas por 776F08 (representa a 17 casos iguales) y 951F08 ocupan una posición basal junto con otras detectadas en el mismo año en España (1329F08 en Alcalá de Henares, 1902F08 en Alicante, 2295F08 en Ceuta y 5494 F08 en Madrid) y otras encontradas en la base de datos de GenBank de muy diversas procedencias detectadas entre los años 2006 y 2011 con varias de las cuales presentan homólogías superiores al 99% (Tabla 14). La secuencia más próxima a la 1902F08 publicada en GenBank fue FN547021/Paris.FRA/26.09, según indica el método de distancia, de inferencia bayesiana (Figura 41) y el estudio de homología de secuencias utilizado en el análisis. Por otro lado, la secuencia más próxima a la 5495F08 publicada en GenBank fue FJ971763/BuenosAires.ARG/31.08 (representa a 10 secuencias iguales), según indica el método de distancia, de inferencia bayesiana (Figura 41) y el estudio de homología de secuencias utilizado en el análisis (Tabla 14). En consecuencia, parece tratarse de una cepa muy extendida por el mundo, haciendo difícil poder establecer con certeza el origen geográfico de las importaciones del año 2008.

También se incluyen en esta rama la secuencia 3819F06 que, aunque aparentemente segregada de las anteriores sin sustento estadístico, presenta homólogías mayores del 99% con varias de ellas (Tabla 14). Sin embargo, la secuencia más próxima a la 3819F06 publicada en GenBank fue JQ413980/Kannur.IND/09.09, según los diferentes análisis (Figura 41,

tabla 14)). Finalmente, la secuencia más próxima a 69F04 publicada en GenBank fue FN547017/Bordeaux.FRA/27.04SRC, igualmente según todos los análisis. (Figura 41, tabla 14).

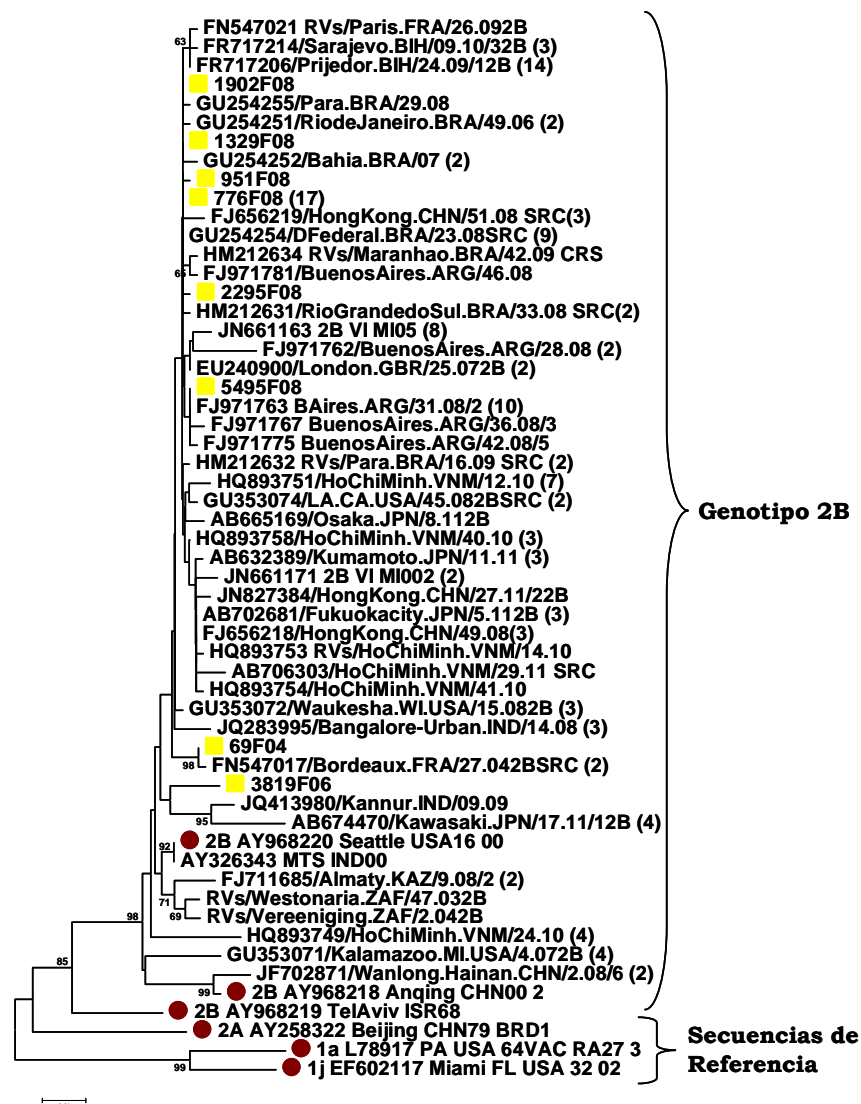


Figura 40. Árbol filogenético con el método de *Neighbor-Joining* de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Este muestra los aislamientos y las muestras del brote de RUBV del 2008 en Algeciras (Cádiz) y cuatro secuencias esporádicas: 1329F08 y 5495F08 del 2008, 64F04 del 2004 y 3819F06 del 2006 (■), y también, algunas secuencias de referencia, que representan a las diez secuencias aceptadas y a las tres secuencias de los genotipos provisionales 1h, 1i y 1j (●). Además, incluye otras secuencias del genotipo 2B. La secuencia 776F08 representa el 85,0% (17 de 20) de todas las muestras analizadas del brote. Los números dentro de los paréntesis representan el número de secuencias iguales. En la figura solo se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 49.

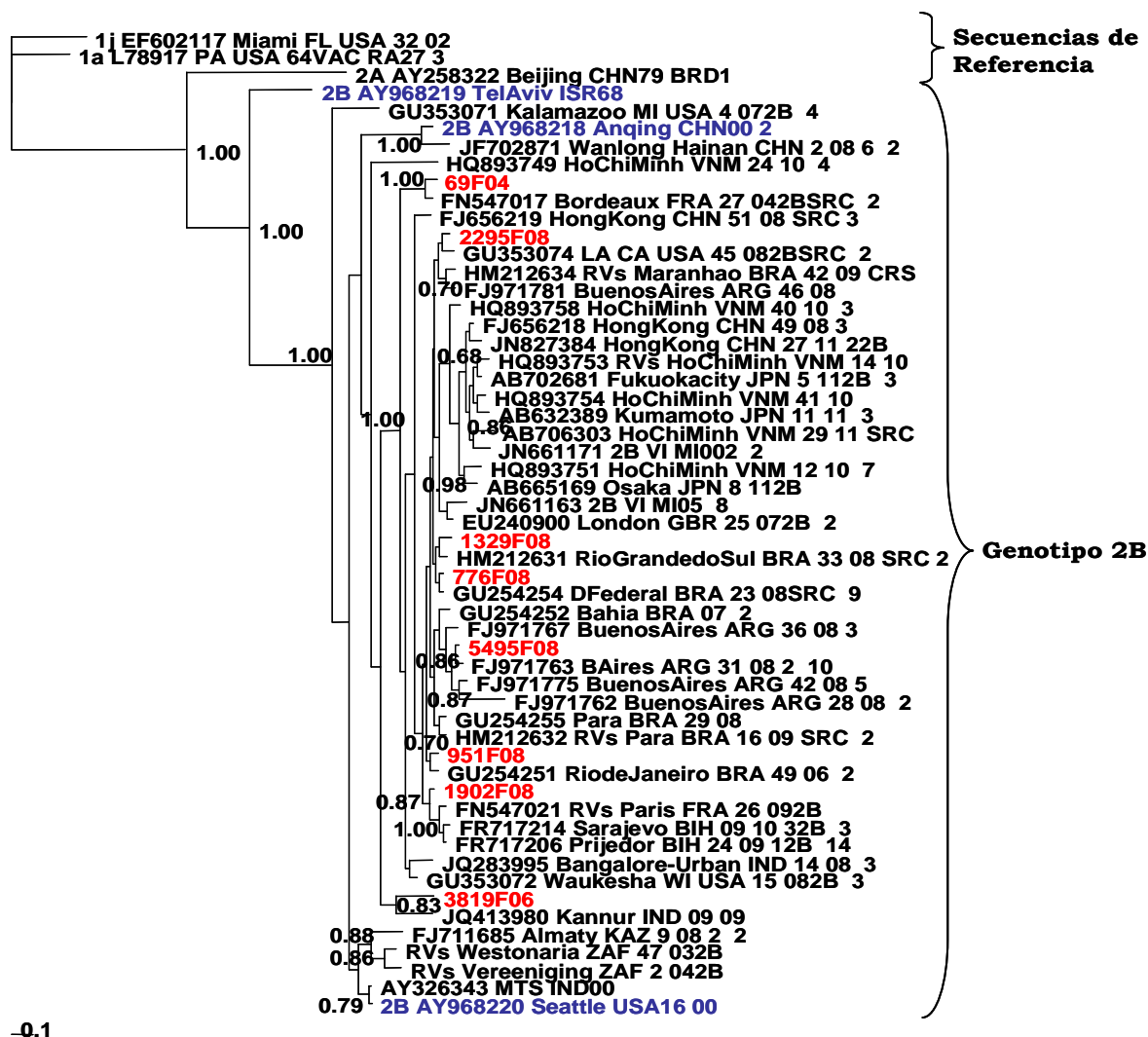


Figura 41. Árbol filogenético con la inferencia bayesiana de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Se señalan las muestras de España del genotipo 2B (color rojo), las secuencias de referencia del genotipo 2B (color azul) y algunas secuencias de referencia aceptadas y provisionales (color negro). Además, se incluye otras secuencias del genotipo 2B (color negro). Los números dentro de los paréntesis representan el número de secuencias iguales. En la figura solo se muestran los valores de “probabilidad posterior” mayores de 0,49.

Tabla 14. Porcentaje de homología de la ventana de 739 nts del gen E1 recomendado por la OMS de todos las muestras clínicas analizadas del genotipo 2B y secuencias de referencia de todos los genotipos utilizando el método Megalign del programa Lasergene 7.0.

Secuencias	69F04	2295F08	951F08	1329F08	1902F08	3819F06	5495F08	776F08(17)
2B_AY968220	98.4	98.4	98.4	98.2	98.4	98.1	98.4	98.5
2B_AY968218	96.6	96.9	96.9	96.8	96.9	96.6	96.9	97
2B_AY968219	94.9	94.7	94.7	94.6	94.7	94.3	94.7	94.9
GU254255	98.6	99.7	99.7	99.6	99.7	97.8	99.7	99.9
FN547017(2)	99.6	98.8	98.8	98.6	98.8	97.8	98.8	98.9
FJ656219(3)	98.5	99.3	99.3	99.2	99.3	99.6	99.3	99.5
FJ971763(10)	98.5	99.6	99.6	99.5	99.6	99.6	99.9	99.7
FN547021	98.4	99.5	99.5	99.3	99.7	97.5	99.5	99.6
JQ413980	97.4	97.7	97.7	97.5	97.7	97.9	97.7	97.8
FR717206(14)	98.5	99.6	99.6	99.5	99.9	97.7	99.6	99.7
HM212631(2)	98.6	99.7	99.7	99.6	99.7	97.8	99.7	99.9
FJ971781	98.5	99.6	99.6	99.5	99.6	99.6	99.6	99.7
EU240900(2)	98.6	99.7	99.7	99.6	99.7	97.8	99.7	99.9
GU254251(2)	98.6	99.7	99.7	99.6	99.7	97.8	99.7	99.9
GU254252(2)	98.5	99.6	99.6	99.5	99.6	99.6	99.6	99.7
AB674470(4)	96.4	96.7	96.7	96.5	96.7	96.7	96.7	96.8
1j_EF602117	90.9	90.9	90.9	90.7	90.9	90.0	90.9	90.0
1j_AB238919	90.5	90.5	90.5	90.4	90.5	90.0	90.5	90.7
1i_AY161360	90.7	90.0	90.0	89.9	90.0	89.9	90.0	90.2
1a_L78917	90.3	90.3	90.0	89.9	90.0	90.2	90.0	90.2
1G_AM258945	89.4	89.1	89.1	88.9	89.1	88.9	90.0	89.2
1h_AM258953	89.7	89.2	89.2	89.1	89.2	88.7	89.2	89.4
1i_AY161352	90.5	90.2	90.2	90.1	90.2	90.0	90.2	90.4
1h_DQ454161	90.5	89.9	89.9	89.7	89.9	89.4	89.9	90.0
1G_EF588970	89.9	89.6	89.6	89.4	89.6	89.2	89.6	89.7
1G_EF588978	90.6	90.3	90.3	90.2	90.3	90.2	90.3	90.5
2C_DQ085340	92.8	93.4	93.1	93.0	93.1	92.8	93.1	93.3
2C_DQ388279	92.8	93.4	93.1	93.0	93.1	92.5	93.1	93.3
1a_AF188704	90.5	91.0	90.6	90.5	90.6	90.9	90.6	90.8
1a_M30776	90.9	91.4	91.1	91.0	91.1	91.4	91.1	91.3
1a_AB047330	89.9	90.2	89.9	10.3	89.9	90.0	89.9	90.0

2A_AY258322	92.9	92.4	92.4	92.3	92.4	92.2	92.4	92.5
2A_AY258323	92.5	91.9	91.9	91.8	91.9	91.9	91.9	92.1
1B_AY968207	90.7	90.7	90.7	90.5	90.7	90.5	90.7	90.8
1B_AY968208	90.8	90.8	90.8	90.7	90.8	90.3	90.0	90.0
1B_AY968209	89.2	89.5	89.2	89.1	89.5	90.0	89.2	89.4
1E_AY968210	89.3	88.8	88.8	88.6	88.8	88.6	88.8	88.9
1C_AY968211	88.9	89.2	88.9	88.8	88.9	89.1	88.9	89.1
1C_AY968212	90.7	91.0	90.7	90.6	90.7	91.2	90.7	90.9
1F_AY968213	88.2	88.9	88.5	88.4	88.5	89.7	88.5	88.7
1D_AY968214	90.5	90.4	90.0	89.9	90.0	90.4	90.2	90.2
1F_AY968215	89.0	89.7	89.4	89.2	89.4	89.5	89.4	89.5
1D_AY968216	89.6	89.9	89.6	89.4	89.7	90.4	89.6	89.7
1C_AY968217	90.4	90.6	90.2	90.1	90.2	90.1	90.4	90.4
1E_AY968221	89.9	90.2	89.9	89.7	89.9	90.0	90.1	90.1
Media	93.1	93.4	93.3	91.4	93.3	93.0	93.3	93.4
Rango	88.2 - 99.6	88.8 - 99.7	88.5 - 99.7	88.4 - 99.6	88.5 - 99.9	88.6 - 99.6	88.5 - 99.9	88.7 - 99.9

Las 17 secuencias idénticas del brote representadas por 776F08, mostraron 11 posiciones variables o sitios polimórficos con respecto a la cepa de referencia 2B AY968220 (RVI/Seattle.USA/16.00[2B]). Otra secuencia del brote (951F08) y las esporádicas (1329F08, 1902F08, 2295F08 y 5495F08) presentaron variaciones nucleotídicas adicionales. La 951F08 presenta una variación nucleotídica adicional, de citosina por timina en la posición 429; la 1329F08 presenta dos variaciones nucleotídicas adicionales, de citosina por guanina en la posición 41 y de timina por guanina en la posición 45; la 1902F08 presenta una variación nucleotídica adicional, de guanina por adenina en la posición 97; la 2295F08 presenta una variación nucleotídica adicional, de timina por citosina en la posición 148; y la 5495F08 presenta una variación nucleotídica adicional, de adenina por guanina en la posición 412, del fragmento analizado. Solo tres de estas variaciones nucleotídicas llevaron aparejado un cambio de amino, una presente en la secuencia 951F08 (posición 429), que afectó la segunda base del codón causando un cambio de aa (A303V) y dos presentes en la secuencia 1329F08 (posiciones 41 y 45), que afectaron la primera y segunda base del codón, respectivamente, causando cambios de aa (P15A y V16G). Estos cambios no están en una región inmunorreactiva (41, 73, 116, 171).

La secuencia 776F08, elegida para representar a 17 de las 18 (94,4%) secuencias analizadas del brote (Tabla 15; Figuras 40 y 41), es la que estuvo presente en el primer caso detectado, sin que se observara ningún cambio hasta cuatro semanas después (Tabla 15).

Tabla 15. Diferencias en los nucleótidos y las secuencias de aminoácidos en el único grupo y secuencias individuales comparadas con la secuencia de referencia RVI/Seattle.USA/16.00[2B] y la secuencia mayoritaria (776F08) en la ventana de 739 nts del gen E1.

Grupos	Secuencias (secuencias iguales)	Números de accesos al GenBank	Cambios en los 739 nts del gen E1 con respecto al prototipo 1j EF602117			Cambios nucleotídicos (cambios de aminoácidos) en 739 nt del gen E1 776F08*
			nt	Semanas	Cambios aa	
1	776F08	_____	11	5/2008	No	
	presente en 17 secuencias			a 15/2008		
No agrupadas y esporádicas que circularon el mismo año	951F08	_____	12	9	A303V	C429T(A302V)
	1329F08	_____	12	12	P15A V16G	C41G(P173A), T45G(V174G)
	1902F08	_____	12	15	No	G97A
	2295F08	_____	12	19	No	T148C
Esporádicas fuera del brote	5495F08	_____	12	47	No	
	69F04	_____	12	1	No	
	3819F06	_____	15	44	No	

5.3 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1a.

La homología observada entre todas las secuencias 1a españolas analizadas y las cepas de referencia, presenta un rango comprendido entre 99,6 a 99,7% para 1a, y de 89,7% (2A) a 97,1% (1E) para los otros genotipos (Tabla 16). Todas las secuencias analizadas formaron un clado bien soportado en el árbol filogenético (Figuras 42 y 43) y se agruparon con la cepa de referencia 1a L78917 (RA27/3) con un valor de *bootstrap* significativo de 91 con el análisis de *Neighbor-Joining* (Figura 42) y una probabilidad posterior de 0,99 con el análisis bayesiano (Figura 43). Además, estas cinco secuencias españolas, presentan un rango de homología entre 99,9 a 100,0% con la secuencia vacunal 1a utilizada en España y en nuestro laboratorio, VacRUBVEsp (RA27/3) (Tabla 16). Todos estos resultados permiten que las secuencias españolas sean consideradas como de origen vacunal. Una de ellas fue detectada en una niña de 11 años de Madrid, de la SE 5 del 2003 (165F03). Otra de una joven de 14 años de Madrid, de la SE 12 del año 2009 (200931536) (Figuras 42 y 43), VIH positiva, con exantema y sin antecedentes conocidos de vacunación y negativa a IgM e IgG de RUBV. En cuanto a las otras tres (200941531, 200941536 y 200946570), proceden de un niño de 12 años de Madrid con leucemia mieloblástica aguda que es sometido a trasplante alogénico el 31 de abril de 2009, presentando a 29 de junio cuadro de hepatopatía, diarrea y disminución de consciencia coincidente con resultado positivo a RUBV (genotipo 1a) por RT-PCR de virus exantemáticos en médula ósea (negativo en suero, heces y biopsia de colon). Este resultado positivo se repite en muestras de sangre y/o suero de fechas 2, 6, 9, 13, 16, 21 de julio y de biopsia de colon de 21 de julio. A 21 de julio el cuadro se agrava con cistitis hemorrágica y fallo hepático. Se desconocen antecedentes de vacunación en estos casos, aunque atendiendo a su edad a ninguno de ellos le correspondería por calendario. Resulta llamativo que dos de estos pacientes sean inmunodeprimidos sin antecedentes de vacunación reciente, por lo que el contagio hubo de producirse por otra fuente.

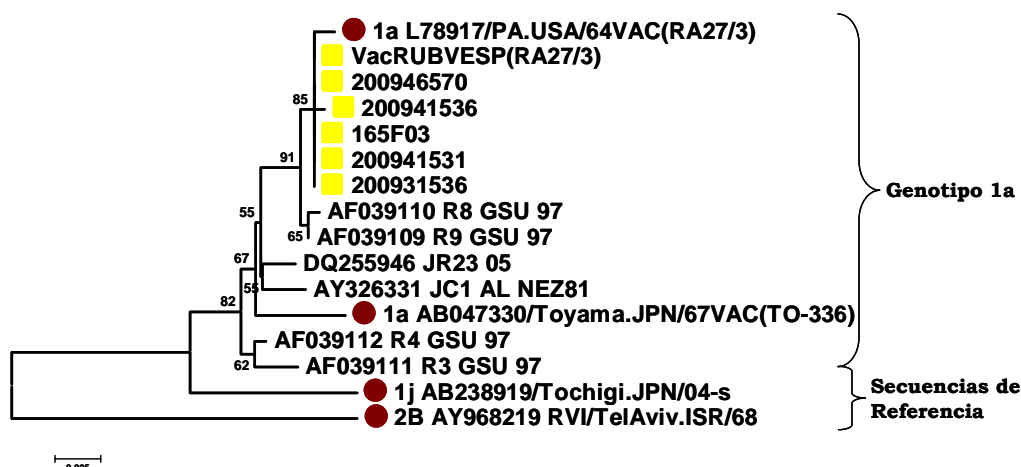


Figura 42. Árbol filogenético con el método de *Neighbor-Joining* de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Este incluye una secuencia de una muestra vacunal del brote de RUBV del 2003 en la Comunidad de Madrid: 165F03, una secuencia esporádica del 2009: 200931536 y tres secuencias de tres muestras distintas de un caso neurológico en Madrid en el 2009: 200941531, 200941536 y 200946570 y la secuencia de la vacuna de RUBV utilizada en España: VacRUBVEsp(RA27/3) (■). También se muestran las de dos secuencias de referencia, que representan a las diez secuencias aceptadas y a las tres secuencias de los genotipos provisionales 1h, 1i y 1j (●). Además, se incluye otras secuencias del genotipo 1a. En la figura solo se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 49.

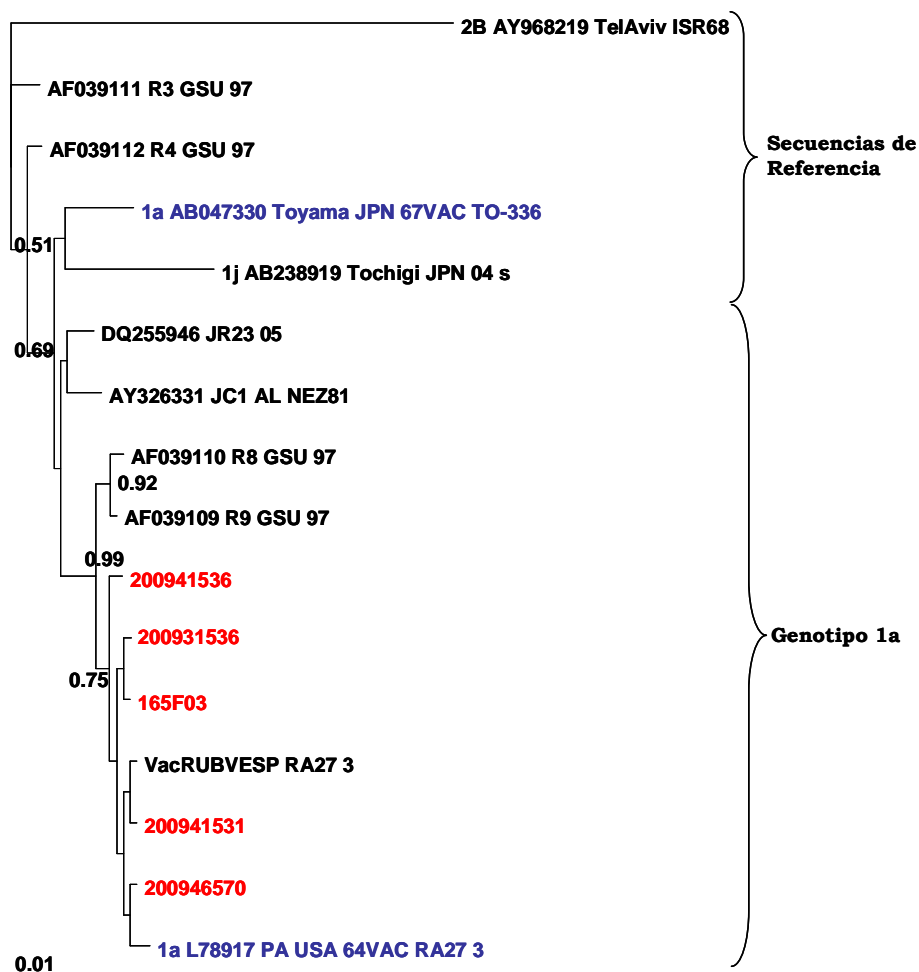


Figura 43. Árbol filogenético con la inferencia bayesiana de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Se señalan las muestras de España del genotipo 1a (color rojo), las secuencias de referencia del genotipo provisional 1a (color azul) y algunas secuencias de referencia aceptadas y provisionales (color negro). Además, se incluye otras secuencias del genotipo 1a (color negro). Los números dentro de los paréntesis representan el número de secuencias iguales. En la figura solo se muestran los valores de "probabilidad posterior" mayores de 0,49.

Tabla 16. Homología de la ventana de 739 nts del gen E1 recomendado por la OMS de todos las muestras clínicas analizadas de genotipo 1a y secuencias de referencia de todos los genotipos utilizando el método Megalign del programa Lasergene 7.0.

Secuencias	200931536	200946570	165F03	200941536	200941531
1a_L78917(RA27/3)	99.7	99.7	99.7	99.6	99.7
1a_AB047330(TO-336)	98.1	98.1	98.1	98	98.1
VacRUBVESP(RA27/3)	100	100	100	99.9	100
DQ255946	98.9	98.9	98.9	98.8	98.9
AY326331	98.8	98.8	98.8	98.6	98.8
AF039112	98.8	98.8	98.8	98.6	98.8
AF039111	99.3	99.3	99.3	99.2	99.3
AF039110	99.6	99.6	99.6	99.5	99.6
AF039109	99.7	99.7	99.7	99.6	99.7
1i_AY161352	96.8	96.8	96.8	96.7	96.8
1i_AY161360	96.5	96.5	96.5	96.4	96.5
1E_AY968221	97.1	97.1	97.1	96.9	97.1
1E_AY968210	96.4	96.4	96.4	96.2	96.4
1j_EF602117	96.4	96.4	96.4	96.2	96.4
1j_AB238919	96.4	96.4	96.4	96.2	96.4
1h_AM258953	95.3	95.3	95.3	95.2	96.4
1h_DQ454161	96.2	96.2	96.2	96.1	96.2
1G_EF588970	95.4	95.4	95.4	95.2	95.4
1G_AM258945	95.5	95.5	95.5	95.3	95.5
1G_EF588978	95.9	95.9	95.9	95.8	95.9
1a_AF188704	97.2	97.2	97.2	97.1	97.2
1a_M30776	96.8	96.8	96.8	96.7	96.8
1B_AY968207	98.4	98.4	98.4	99.2	98.4
1B_AY968208	97.5	97.5	97.5	97.4	97.5
1B_AY968209	96.8	96.8	96.8	96.6	96.8
1C_AY968211	94.5	94.5	94.5	94.3	94.5
1C_AY968217	96.4	96.4	96.4	96.2	96.4
1C_AY968212	97.2	97.2	97.2	97.1	97.2
1F_AY968213	95.8	95.8	95.8	95.6	95.8
1F_AY968215	96.4	96.4	96.4	96.2	96.4
1D_AY968214	97.1	97.1	97.1	96.9	97.1

RESULTADOS

1D_AY968216	95.8	95.8	95.8	95.6	95.8
2A_AY258322	90.8	90.8	90.8	90.7	90.8
2A_AY258323	89.8	89.8	89.8	89.7	89.8
2B_AY968220	91.0	91.0	91.0	90.8	91.0
2B_AY968218	90.2	90.2	90.2	90.0	90.2
2B_AY968219	91.7	91.7	91.7	91.6	91.7
2C_DQ085340	93.0	93.0	93.0	92.8	93.0
2C_DQ388279	93.3	93.3	93.3	93.1	93.3
Media	96.4	96.4	96.4	96.3	96.5
Rango	89.8 - 100.0	89.8 - 100.0	89.8 - 100.0	89.7 - 99.9	89.8 - 100.0

5.4 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1E.

La homología observada entre todas las secuencias 1E españolas analizadas y las cepas de referencia presenta un rango comprendido entre 97,3 a 98,5% para 1E, y de 88,9% (2B) a 97,1% (1B) para los otros genotipos (Tabla 17). Las secuencias analizadas formaron un grupo bien soportado en el árbol filogenético (Figuras 37) y se agruparon con la cepa de referencia 1E (AY968221 RVI/MYS/01), con un valor de *bootstrap* significativo de 80 con el análisis de *Neighbor-Joining*. Todos estos resultados permiten que las secuencias españolas sean asignadas al genotipo 1E. Las cuatro muestras de colección analizadas, disponibles en el CNM, corresponden a un niño de 15 días nacido con SRC en La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, en la SE 8 del año 1998 (216C98); a dos mujeres de 26 años de la SE 8 (1083F03) y 18 años de la semana 10 (1085F03), que se infectaron en un pequeño brote de RUBV ocurrido en Madrid, entre el 17 de febrero y el 10 de marzo del 2003 (153) y a un joven de 13 años de Málaga, que se infectó en la semana 16 del 2009 (200928382) (Figuras 44 y 45). La cepa 216C98, presentó un valor de probabilidad posterior significativo de 0,83 con la inferencia bayesiana (Figura 45) y 99,7% de homología con la secuencia FN546984/POR/18.98 de Portugal, además, una homología de 99,6% con la secuencia FN546967/Caen.FRA/23.95, que representa a 10 secuencias francesas que circularon entre 1995 a 2000 (Tabla 17). Las secuencias 1083F03 y 1085F05 (representantes del brote de Madrid del 2003) forman un subgrupo independiente pero presentan las mayores homologías con una secuencia italiana del año 97 AY161379/ITA/97 (99%), así como con la secuencia francesa FN546967/Caen.FRA/23.95 (representa a 10 secuencias francesas iguales que circularon entre 1995 a 2000) (tabla 17). La cepa 200928382, presentó un valor de probabilidad posterior significativo de 0,84 con la inferencia bayesiana (Figura 45), 98,3% de homología con la secuencia EF210051/Londres.GBR/8.05 y de 97,8% con la secuencia AM258954/Minsk.BLR/24.04, además, de 98,5% con la secuencia AY161379/ITA/97.

A la vista de todos estos resultados, todo parece indicar que el origen de las cepas importadas de genotipo 1E es posiblemente europeo.

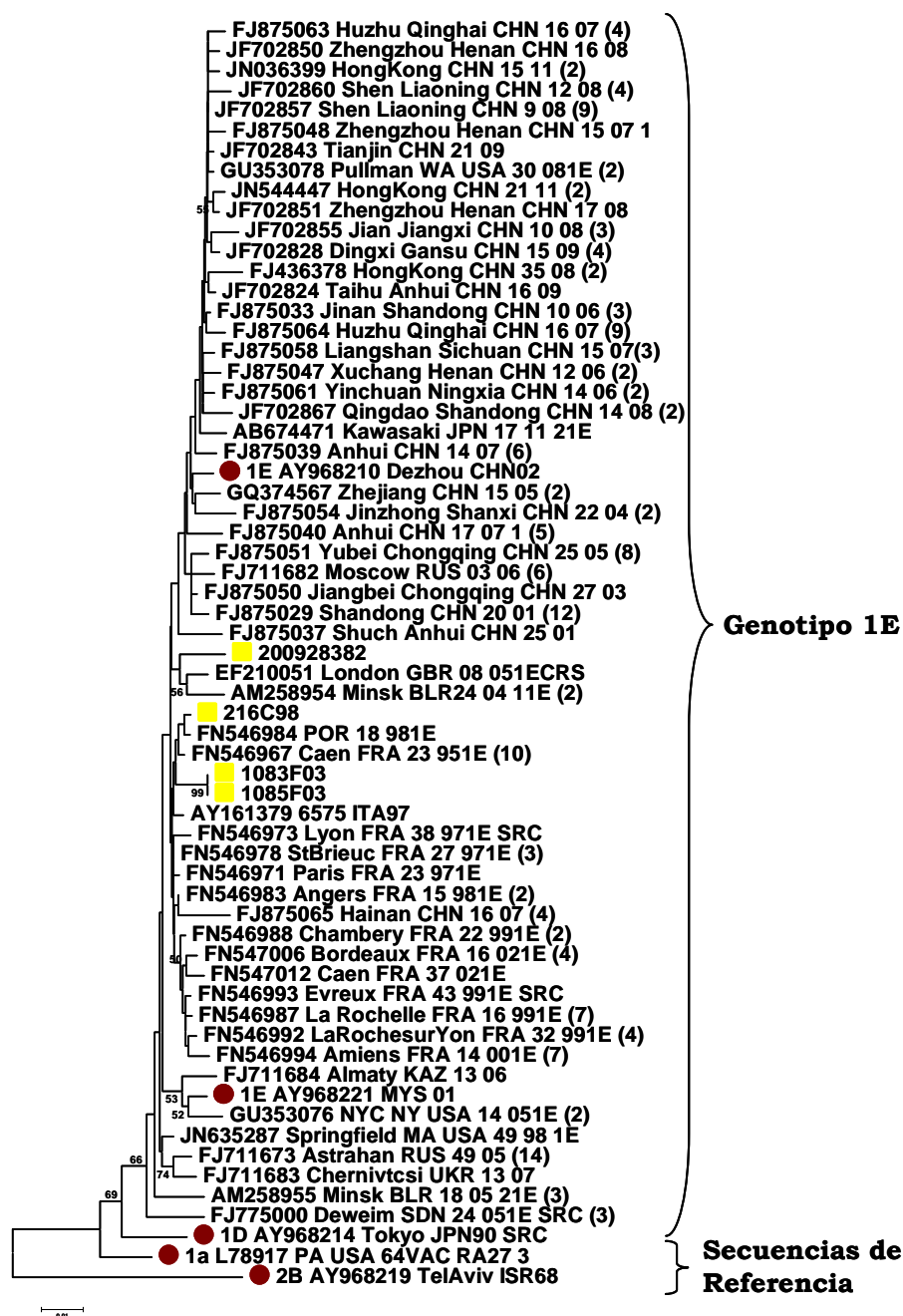


Figura 44. Árbol filogenético con el método de *Neighbor-Joining* de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Este muestra algunas secuencias del brote de RUBV del 2003 en la Comunidad de Madrid (1083F03 y 1085F03) y dos secuencias esporádicas: 216C98 de 1998 y 0928382F de 2009 (■), y también, algunas secuencias de referencia, que representan a las diez secuencias aceptadas y a las tres secuencias de los genotipos provisionales 1h, 1i y 1j (●). Además, incluye otras secuencias del genotipo 1E. Los números dentro de los paréntesis representan el número de secuencias parecidas. En la figura solo se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 49.

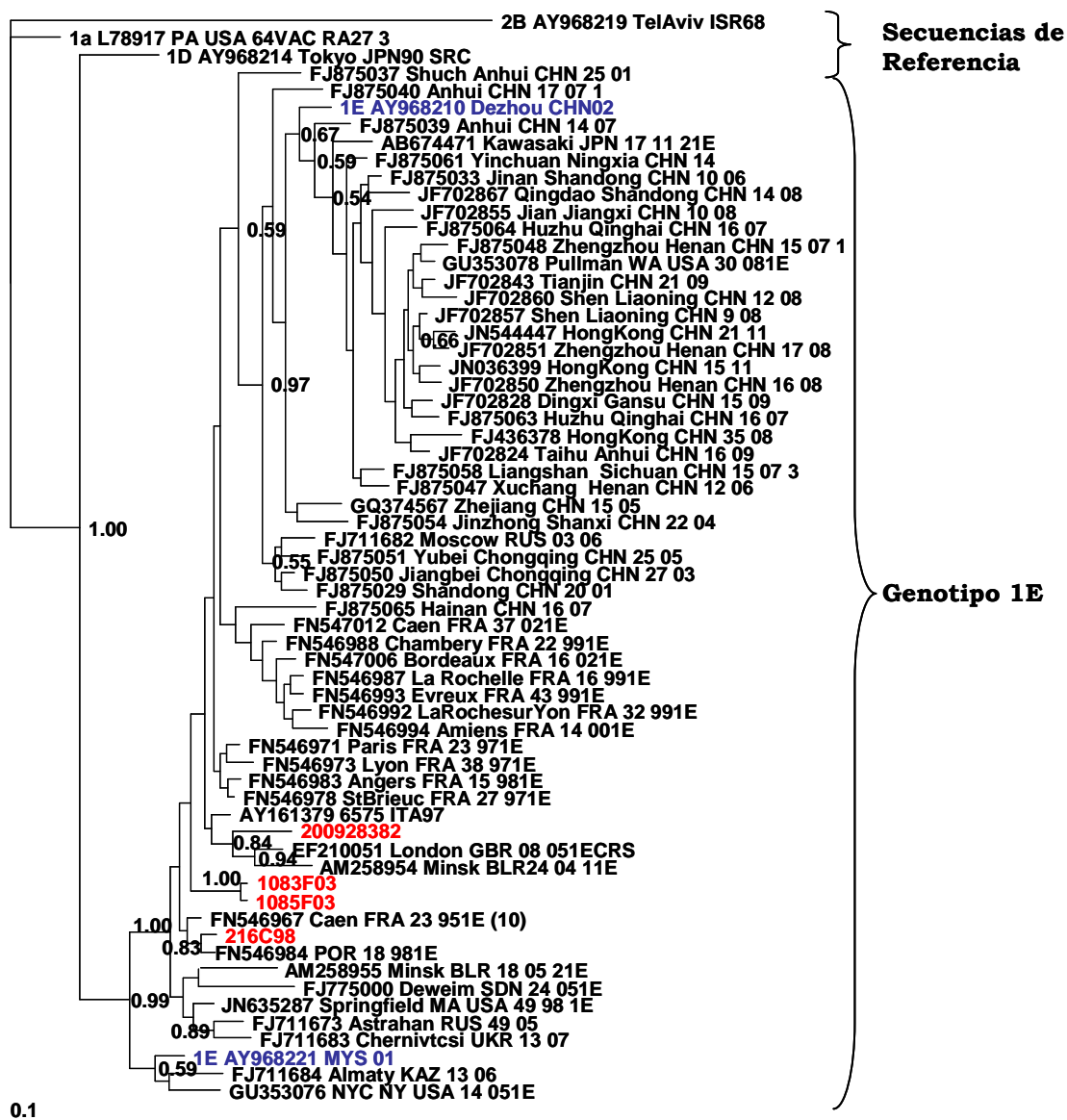


Figura 45. Árbol filogenético con la inferencia bayesiana de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Se señalan las muestras de España del genotipo 1E (color rojo), las secuencias de referencia del genotipo provisional 1E (color azul) y algunas secuencias de referencia aceptadas y provisionales (color negro). Además, se incluye otras secuencias del genotipo 1E (color negro). Los números dentro de los paréntesis representan el número de secuencias iguales. En la figura solo se muestran los valores de “probabilidad posterior” mayores de 0,49.

Tabla 17. Homología de la ventana de 739 nts del gen E1 recomendado por la OMS de todos las muestras clínicas analizadas del genotipo 1E y secuencia de referencia utilizando el método Megalign del programa Lasergene 7.0.

Secuencias	216C98	1083F03	1085F03	200928382
1E_AY968221	98.4	97.8	97.8	97.3
1E_AY968210	98.5	98.4	98.4	97.7
EF210051	98.6	98.1	98.1	98.3
AY161379	99.3	99.0	99.0	98.5
AM258955(3)	98.2	97.9	97.9	97.4
AM258954(2)	98.1	97.5	97.5	97.8
FN546973(41)	99.2	98.6	98.6	98.3
FN546984	99.7	98.9	98.9	98.6
FN546967(10)	99.6	99.0	99.0	98.5
FJ875037(102)	98.4	97.8	97.8	97.8
GU353076(2)	97.9	97.4	97.4	96.8
JN635287(16)	99.3	98.8	98.8	98.5
FJ775000	97.9	97.4	97.4	96.9
1j_EF602117	95.9	95.4	95.4	95.3
1j_AB238919	95.9	95.4	95.4	95.4
1i_AY161360	95.1	94.6	94.6	94.5
1i_AY161352	95.9	95.4	95.4	95.4
1a_L78917	96.8	96.2	96.2	95.9
1h_AM258953	94.5	93.7	93.7	93.3
1h_DQ454161	95.1	94.3	94.3	93.9
1G_EF588970	94.9	94.3	94.3	93.6
1G_AM258945	95.4	94.6	94.6	94.3
1G_EF588978	95.4	94.6	94.6	94.2
1a_AF188704	96.1	96.0	96.0	94.9
1a_M30776	95.4	94.6	94.6	94.2
1a_AB047330	96.5	96.2	96.2	95.4
1B_AY968207	97.1	96.5	96.5	96.2
1B_AY968208	96.4	95.8	95.8	95.5
1B_AY968209	95.2	94.9	94.9	94.6
1C_AY968211	93.1	93.1	93.1	92.2
1C_AY968217	95.5	95.4	95.4	94.6

1C_AY968212	95.7	95.5	95.5	94.8
1F_AY968213	95.5	94.6	94.6	94.6
1F_AY968215	95.6	95.2	95.2	94.2
1D_AY968214	96.9	96.7	96.7	95.8
1D_AY968216	96.1	96.1	96.1	95.2
2A_AY258322	90.2	90.2	90.2	90.5
2A_AY258323	89.2	89.2	89.2	89.5
2B_AY968220	90.0	89.7	89.7	90.0
2B_AY968218	89.2	88.9	88.9	89.2
2B_AY968219	90.8	90.2	90.2	91.1
2C_DQ085340	91.9	91.8	91.8	92.2
2C_DQ388279	92.2	92.1	92.1	92.5
Media	95.7	95.3	95.3	95.0
Rango	89.2 - 99.7	88.9 - 99.0	88.9 - 99.1	89.5 - 98.6

Estas cuatro secuencias analizadas, mostraron 12, 15, 15 y 18 posiciones variables o sitios polimórficos con respecto a la cepa de referencia 1E AY968221 (RVI/MYS/01), respectivamente. De las 27 posiciones variables encontradas, solo 9 son coincidentes entre las cuatro secuencias. Solo dos de estas variaciones, presentes en la secuencia 1083F03 y 1085F03, cuya sustituciones nucleotídicas, adenina por guanina en la posición 524, del fragmento analizado, afectó la primera base del codón, produciendo un cambio de aa, T335A, y de adenina a timina en la posición 541, del fragmento analizado, afectó la segunda base del codón, produciendo un cambio de aa, F340L. Estos cambios están en una región inmunorreactiva (42, 73, 116, 171).

En resumen, 25 de 27 mutaciones específicas (92,6%) afectaron la posición 3 del codón y permanecieron silentes. Las únicas dos variaciones nucleotídicas no-sinónimas, afectaron la posición 1 y 2 del codón, produciendo cambios en la secuencia de aa.

5.5 ANÁLISIS DE SECUENCIA DE GENOTIPO 1i.

Se identificó un caso esporádico en una paciente del hospital de Guadalajara, Comunidad de Castilla-La Mancha, de 24 años, con enfermedad de base de agammaglobulinemia policlonal autosómica recesiva y con infección respiratoria crónica pendiente de trasplante pulmonar, que desarrolló un cuadro de neutropenia febril en marzo de 2008, momento en el que presentaba IgG frente al RUBV de alta avidéz y PCR negativa en suero. En el mes de mayo, presenta un cuadro neurológico consistente en paraparesia y ataxia, siendo un LCR y un suero del 14 de mayo de 2008, positivos a ARN del RUBV por RT-PCR. El cuadro progresa siendo también positivo en un suero del 2 de julio y negativo en un LCR del día 22 de julio. Del hisopado faríngeo se obtuvo un aislamiento viral. Las secuencias analizadas se agruparon con las secuencias de referencia 1i con un valor de *bootstrap* poco significativo de 57 con el análisis de *Neighbor-Joining* (Figura 46), pero una probabilidad posterior significativa de 0,97 con el análisis

bayesiano (Figura 47). Todos estos resultados permiten que las secuencias españolas sean asignadas al genotipo 1i.

No se conocen antecedentes epidemiológicos relevantes en cuanto a la posible fuente de infección ni existe ninguna secuencia de este genotipo de la misma fecha en GenBank. Se conoce la presencia del genotipo 1i en Europa (Italia, Alemania, Inglaterra) a finales de la década de los 80's y principio de la década de los 90's, del siglo XX, siendo por última vez detectado en Italia en 1994 y considerándose inactivo desde entonces (10), hasta el presente hallazgo.

La homología observada entre todas las secuencias 1i españolas analizadas y las cepas de referencia presenta un rango comprendido entre 96,2 a 97,4% para 1i, y de 88,9% (2A) a 96,4% (1B) para los otros genotipos (Tabla 18). Las secuencias obtenidas de diferentes muestras de este mismo paciente presentan diferencias en diez posiciones distintas (tabla 19).

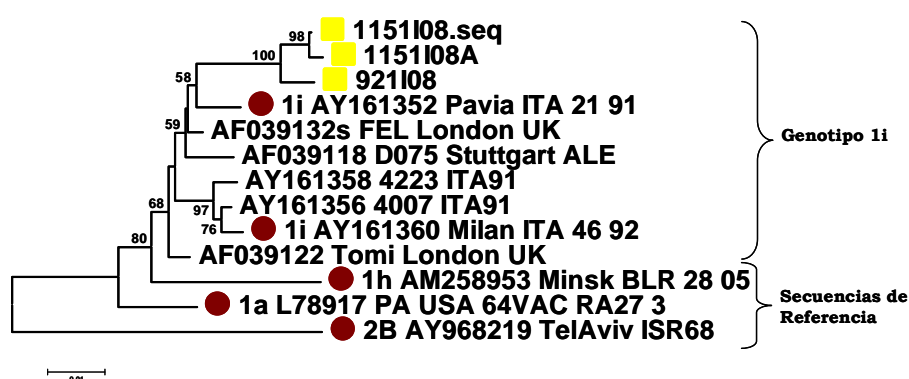


Figura 46. Árbol filogenético con el método de *Neighbor-Joining* de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Este muestra el aislamiento y las muestras clínicas de un caso neurológico ocurrido en el Hospital de Guadalajara, Comunidad de Castilla-La Mancha, en el 2008, del genotipo 1i (■) y algunas secuencias de referencia, que representan a las diez secuencias aceptadas y a las tres secuencias de los genotipos provisionales 1h, 1i y 1j (●). Además, incluye otras secuencias del genotipo 1i. En la figura solo se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 49.

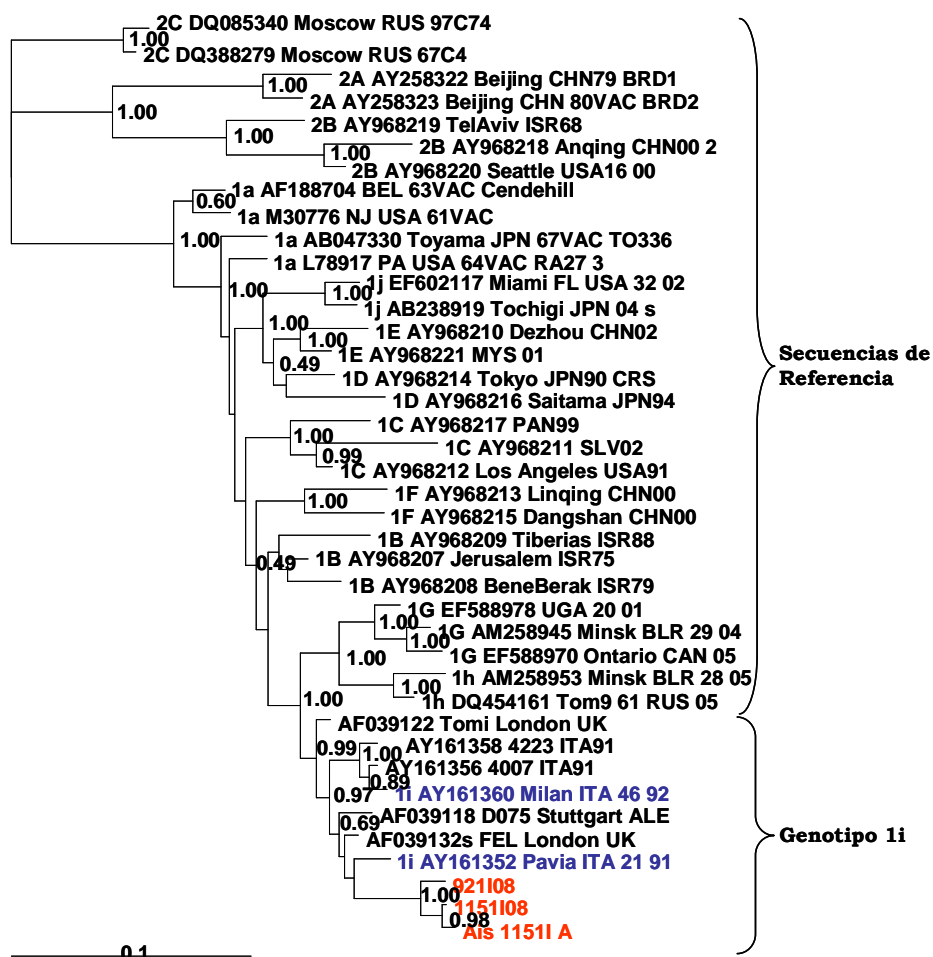


Figura 47. Árbol filogenético con la inferencia bayesiana de la ventana mínima aceptable recomendada por la OMS en el gen E1. Se señalan las muestras de España del genotipo 1i (color rojo), la secuencia de referencia del genotipo provisional 1i (color azul) y todas las demás secuencias de referencia aceptadas, también como las otras secuencias de los genotipos provisionales 1h y 1j (color negro). Además, se incluye otras secuencias del genotipo 1i. En la figura solo se muestran los valores de "probabilidad posterior" mayores de 0.49.

Tabla 18. Homología de la ventana de 739 nts del gen E1 recomendado por la OMS todos las muestras clínicas analizadas y secuencias de referencia del genotipo 1i y de otros genotipos utilizando el método Megalign del programa Lasergene 7.0.

Secuencias	1151108	1151108A	921108
1151108	100.0	99.9	98.8
1151108A	99.5	100.0	98.6
921108	98.8	98.6	100.0
1i_AY161352	97.4	97.2	97.2
1i_AY161360	96.5	96.2	96.5
AY161358	96.5	96.2	96.5
AY161356	96.6	96.4	96.6
AF039132	97.5	97.2	97.8
AF039122	97.1	97.1	97.1
AF039118	96.9	96.7	96.9
1E_AY968221	94.5	94.6	94.5
1E_AY968210	94.2	94.3	93.9
1j_EF602117	94.6	94.8	94.6
1j_AB238919	94.3	94.5	94.3
1a_L78917	94.8	94.8	94.8
1h_AM258953	94.2	94.2	94.2
1h_DQ454161	94.4	94.4	94.4
1G_EF588970	94.3	94.3	94.3
1G_AM258945	94.3	94.3	94.3
1G_EF588978	94.7	94.7	94.7
1a_AF188704	94.0	94.0	94.0
1a_M30776	94.2	94.2	94.2
1a_AB047330	95.1	95.1	95.4
1B_AY968207	96.4	96.4	96.4
1B_AY968208	95.4	95.4	95.4
1B_AY968209	94.2	94.2	93.8
1C_AY968211	92.0	92.0	92.0
1C_AY968217	94.2	94.5	94.5
1C_AY968212	94.9	94.9	94.9
1F_AY968213	94.1	94.2	93.8
1F_AY968215	94.3	94.3	94.3
1D_AY968214	95.4	95.5	95.4
1D_AY968216	93.7	93.9	93.4
2A_AY258322	89.7	90.0	90.1
2A_AY258323	88.9	88.9	89.2
2B_AY968220	90.8	90.8	90.5
2B_AY968218	89.7	89.7	89.7
2B_AY968219	90.0	90.0	89.7
2C_DQ085340	90.9	90.9	90.9
2C_DQ388279	91.3	91.3	91.3
Media	94.5	94.5	94.5
Rango	88.9 - 100.0	88.9 - 100.0	89.2 - 100.0

Tabla 19. Diferencias en los nucleótidos y aminoácidos de las secuencias de exudado faríngeo y aislamiento comparadas con la secuencia 921I08 en la ventana de 739 nts del gen E1.

Número de muestra	Fecha	Muestra	Posición nucleotídica									
			37	55	190	244	247	430	487	523	562	721
921I08	22/05/2008	LCR	T	C	A	C	C	C	T	G	T	G
1151I08	3/07/2008	Ex Far	C	T	.	T	T	T	C	.	C	A
1151I08A	15/07/2008	Aisl.	C	T	G	T	T	T	C	C	C	A

6. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.

6.1 Técnica de Inmunodetección de Proteínas Mediante Transferencia a Membranas Sintéticas (*Western-Blotting*: WB); Desarrollo de la Metodología.

Después de transferir los antígenos a las membrana (sección 5.3 de Materiales y Métodos), se procedió a realizar una serie de experimentos para establecer las concentraciones óptimas de antígenos (proteínas del RUBV purificadas, sección 5.1 de Materiales y Métodos), sueros humanos, así como de anticuerpos anti-IgM y anti-IgG marcados con Peroxidasa (Figura 48). Las determinaciones de IgM e IgG se hicieron en dos membranas diferentes. En base a estos experimentos se seleccionaron las condiciones óptimas para el proceso que se describe a continuación. Se determinó que los sueros a evaluar se debían utilizar diluidos 1:10 en PBS con 5% de leche descremada y 0,1% Tween 20, a un volumen final de 160 µl por pocillo, agitando durante 1 h a TA. Luego, se procedió a lavarlos tres veces con 350 µl PBS-Tween (0,25%) por pocillo, cada 15 min. a TA. Se determinó que la cantidad óptima del antisuero anti-IgG o anti-IgM humana conjugado con Peroxidasa (A0420 Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EEUU) era 160 µl diluidos al 1:100 en PBS con 5% de leche descremada, 0,1% Tween 20, que se añadieron a ambas membranas agitándolas durante 1 h a TA y en oscuridad. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces con 350 µl de PBS-0,25% Tween por pocillo, para evitar contaminación al sacarlas del aparato multipocillos. Luego, se colocaron en envases separados, para lavarlas tres

veces cada 15 min. a TA, con 16 ml de PBS-0,25% Tween por membrana y en oscuridad. Finalmente, se les añade el sustrato y se revelan según indicaciones de la casa comercial (Amersham Western-blotting detection reagents and analysis system, GE Healthcare Reino Unido Limited).

6.2 Resultados del WB.

Se evaluaron 33 sueros de personas con IgM positiva para RUBV e IgG de alta (cuatro) o baja (29) avidez, revelados con anti-IgM humana. En seis de ellos (uno con alta avidez y cinco con baja) no se obtuvo ninguna banda. El patrón de bandas más frecuentemente observado en los otros 28 fue el mismo para ambos grupos de pacientes y correspondió a la presencia simultánea de bandas para las proteínas estructurales C y E1 (tabla 20). Dos de los tres (66%) pacientes con IgG de alta avidez y nueve de 24 (37,5%) de los de baja presentaron este patrón, no siendo las diferencias estadísticamente significativas ($P=0,5350$ por test de Fisher). Ocho de 24 (33,3%) muestras con IgG de baja avidez presentaron banda frente a glicoproteína E2, la cual no apareció en ninguna de las tres con alta avidez, aunque las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas ($P=0,5323$ por test de Fisher). Además, se evaluaron 92 sueros de personas con diferentes resultados serológicos contra la infección por el RUBV revelando con anti-IgG humana (Tabla 21), siendo tres de ellos negativos para todas las bandas. Entre los 89 restantes todos los patrones fueron observados en todos los grupos excepto en el de IgM indeterminada, donde faltaron algunos, aunque este grupo solo tenía seis sueros. El patrón más comúnmente detectado fue el que presentaba banda para las tres proteínas estructurales (C-E2-E1). Este patrón se obtuvo en 16 de 38 (42,1%) sueros con IgM+ e IgG de alta avidez, 9/30 (30,0%) para IgM+ e IgG de baja avidez, 6/18 (33,3%) para IgM- e IgG alta avidez y 1/6 (16,6%) para IgM indeterminada e IgG de alta avidez. Estas diferencias no fueron significativas ($p=0,584$ por Chi cuadrado) (Tabla 21). Tampoco se observan diferencias significativas entre grupos al analizar la frecuencia de bandas de cada proteína individual.

Tabla 20. Características de la respuesta inmune por medio de *western-blotting* de sueros humanos de posibles casos esporádicos y casos involucrados en brotes de rubéola frente a proteínas del RUBV revelado con anti-IgM humana.

Patrón de Bandas	Revelado con anti-IgM Humana							
	C-E2-E1	C-E2	C-E1	E2-E1	C	E2	E1	Neg
IgM+ e IgG alta avidez	0	0	2	0	0	0	1	1
IgM+ e IgG baja avidez	8	0	9	1	5	0	1	5

IgM: inmunoglobulina M; IgG: inmunoglobulina G

Tabla 21. Características de la respuesta inmune por medio de *western-blotting* de sueros humanos de posibles casos esporádicos y casos involucrados en brotes de rubéola frente a proteínas del RUBV revelado con anti-IgG humana.

Patrón de Bandas	Revelado con anti-IgG Humana							
	C-E2-E1	C-E2	C-E1	E2-E1	C	E2	E1	Neg
IgM+ e IgG alta avidez	16	7	8	2	1	3	1	0
IgM+ e IgG baja avidez	9	6	5	2	2	2	3	1
IgM- e IgG alta avidez	6	3	3	1	1	1	1	2
IgM Indeterminada e IgG alta av	1	3	0	0	0	1	1	0

IgM: inmunoglobulina M; IgG: inmunoglobulina G

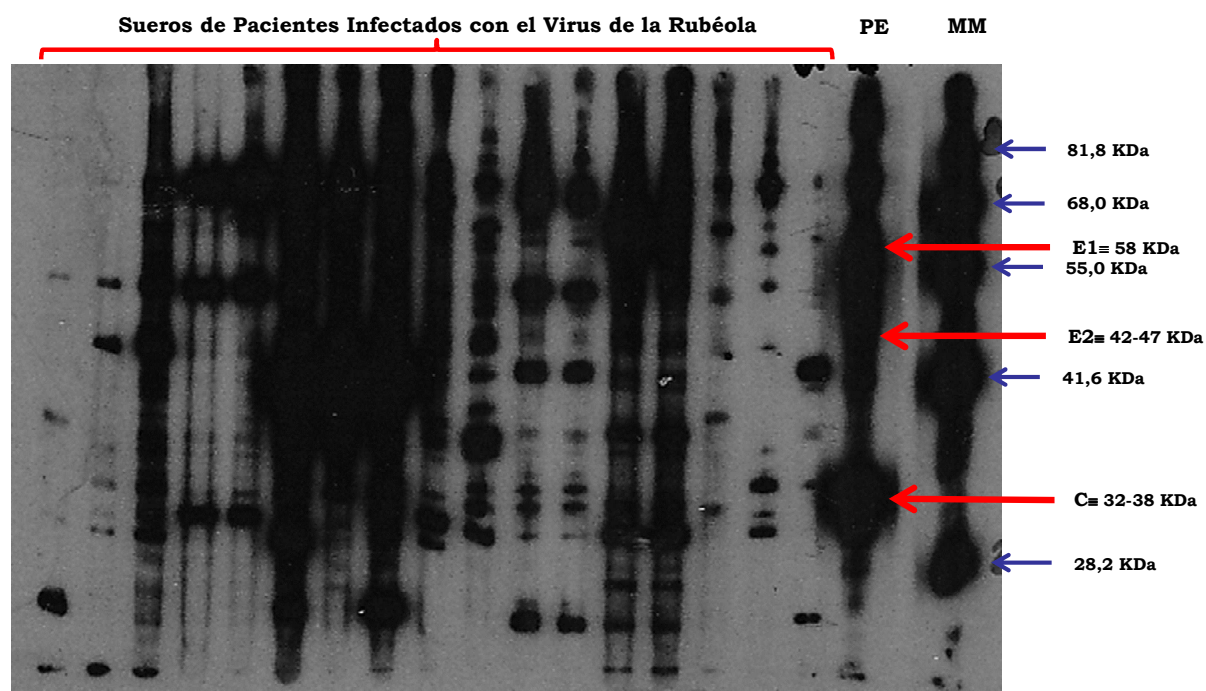


Figura 48. *Western-blotting* de sueros humanos de posibles casos esporádicos y casos involucrados en brotes de rubéola frente a proteínas estructurales del virus de la rubéola revelado con anti-IgG humana.

DISCUSIÓN

En este trabajo se han mejorado y desarrollado técnicas de amplificación de ácidos nucleicos necesarias para el diagnóstico y la caracterización del RUBV (122) requeridas para adecuar el nivel de sensibilidad del sistema de vigilancia epidemiológica a las exigencias del Plan Nacional de Eliminación de Sarampión, Rubéola y SRC, que se instauró en España siguiendo las recomendaciones de la OMS. Dichas técnicas se han evaluado de forma comparativa a las de referencia para diagnóstico de rubéola (aislamiento en cultivos celulares y detección de IgM específica), no sólo con muestras retrospectivas procedentes de la colección del CNM sino también con muestras prospectivas procedentes de todos los laboratorios regionales situados en las distintas CCAA. Los resultados obtenidos mejoran su utilidad para el diagnóstico de rubéola como complemento a las de referencia. Además, se ha podido caracterizar por primera vez el genotipo del RUBV en diferentes casos esporádicos y brotes de rubéola detectados entre los años 1998 y 2009, para obtener una visión muy completa de la situación de esta enfermedad exantemática en España en una etapa próxima a la eliminación de la misma, programada para el 2015 según la Oficina Regional Europea de la OMS (111, 192). Finalmente, se ha completado el estudio tratando de caracterizar la respuesta inmune de los pacientes frente a las proteínas estructurales del RUBV, para poder encontrar resultados que confirmen la infección por este virus y garantizar que no existan resultados falsos positivos, especialmente en mujeres embarazadas, por la implicación que supone ante un posible aborto terapéutico debido a las malformaciones producidas por el RUBV en el feto, el cual está regulado en la legislación española y en la de muchos países en el mundo.

Mejora y evaluación de una técnica de PCR múltiple para virus del sarampión, virus de la rubéola y parvovirus B19 (Objetivo 1).

En estudios previos donde se utilizó la PCR anidada múltiple para virus exantemáticos en muestras clínicas de un brote de RUBV en Madrid 2004/2005, se observó un bajo rendimiento de esta PCR para detectar el RUBV comparada con la prueba serológica de anti-IgM específica (Figura 20)

(122, 154), a pesar que es esperable que las pruebas de detección de genomas sean más sensibles que las pruebas serológicas (8), principalmente cuando la mayoría de las muestras se han tomado uno o dos días después del inicio de síntomas (121). Además, se observó una mayor sensibilidad comparativa en la detección de MeV con esta misma PCR, en el contexto de un brote de sarampión (123). Otros autores describen este mismo problema (57, 203). A fin de solucionarlo, se decidió comparar diferentes coadyuvantes (apartado 4.4 de materiales y métodos), encontrándose que la incorporación de betaína 5 M mejoró ostensiblemente la sensibilidad de esta prueba, aumentándola hasta 4 logaritmos (Figura 19), debido a que la betaína reduce la formación de estructuras secundarias en regiones ricas de GC tanto en el ARN como en el ADN, permitiendo a la retrotranscriptasa y a la ADN polimerasa un mejor acceso a la secuencia molde (82, 84). Este es el caso del genoma del RUBV, el cual, es rico en GC (69,5%) (40, 70, 105), por lo cual se hace difícil la retrotranscripción y la amplificación de este virus (35). Además de este aumento en la sensibilidad, también se observó un aumento en la intensidad de las bandas amplificadas para el MeV y especialmente, para el B19V (Figura 19), lo que nos hace pensar que la incorporación de la betaína 5 M, no solo mejora la amplificación del RUBV, sino también la de los otros dos virus que se detectan con esta PCR anidada múltiple, MeV y B19V. Después de observar esta mejora en la sensibilidad en pruebas de diluciones de semillas, se procedió a validar la PCR modificada a partir de muestras clínicas como exudado faríngeo, orina y suero, que son las recomendadas por la OMS para el diagnóstico de rubéola postnatal. Para ello, se utilizaron muestras del mismo brote de RUBV ocurrido en Madrid en el 2004/2005 con el que se había valorado inicialmente la técnica (122). Con la PCR modificada se observó un aumento del 42,4% de casos positivos en exudado faríngeo, del 24,2% en suero y del 37,4% en orina (Tabla 9; Figuras 20 y 21) (122). Con esta PCR modificada, el exudado faríngeo siguió siendo la muestra en la que se observó mayor rendimiento en la obtención de resultados positivos en momentos tempranos de la enfermedad, al igual que lo observado por Mosquera *et al.* (2006) (122), hecho que se corresponde con la patogenia del virus pues es el primer lugar en el que este virus comienza a

excretarse después de la infección (40). Utilizando de manera combinada la detección en faringe y de IgM específica para el RUBV, se diagnosticaron el 77,3% (58/75) de los casos, lo que supone tan solo un incremento del 6,3% en comparación con lo obtenido con la PCR sin modificar (122), y que corresponde a la ganancia de casos negativos a IgM. Así, prescindiendo de la RT-PCR se hubiesen perdido un 27,6% de los casos y prescindiendo de la IgM, un 5,2%, por lo que se confirma que ambas técnicas deben ser empleadas de forma complementaria para poder detectar la mayoría de los casos de rubéola, al igual que lo presentado por otros autores (8, 122). La alta sensibilidad observada en los experimentos con la RT-PCR anidada múltiple para virus exantemáticos modificada con betaína concuerdan, a su vez, con estudios previos (24, 85, 123, 144, 168), lo que confirma que ésta es una herramienta muy útil para el diagnóstico de la infección por RUBV.

Habitualmente, el diagnóstico de RUBV se basa en la detección de IgM específica por técnicas de ELISA o IFI. Sin embargo, los resultados presentados aquí demuestran que la detección de ARN con la RT-PCR anidada múltiple modificada usando muestras de exudado faríngeo y orina, proporciona un marcador más sensible, coincidiendo con lo presentado por Mosquera *et al.* (2006) (122). Esto podría deberse, en nuestro caso, a que la recogida de muestras se produjo en los primeros momentos de la infección en el contexto de este brote. La mayoría de las muestras utilizadas en este estudio se tomaron en los días 1 al 3 (40 exudados faríngeos y 41 sueros) después del inicio del exantema. El uso de las pruebas de detección directa como ésta, también permite el diagnóstico de casos de rubéola con IgM negativa e IgG positiva, tanto en pacientes con inmunidad natural que sufren reinfecciones como cuando se producen falsos negativos de la técnica de ELISA (58, 80). Aunque la PCR realizada en exudados faríngeos y orina proporciona un marcador diagnóstico más sensible, la amplificación del genoma directamente en suero debe intentarse en ausencia de estas muestras si se quiere intentar caracterizar el genotipo del virus. Cada vez se acepta con más frecuencia un positivo a rubéola por RT-PCR como criterio de confirmación de caso de rubéola en ausencia de muestra de suero, aunque, es necesario resaltar que la técnica de referencia sigue siendo la

detección de IgM específica en suero, y que cualquier resultado obtenido únicamente por PCR debería confirmarse en un suero de fase aguda o convaleciente cuando sea posible. Por otra parte, según los protocolos actuales, un resultado negativo por PCR en ausencia de determinación de IgM no permite descartar el caso como negativo (6, 111).

Desarrollo de metodología de genotipado y estudio de los patrones generales de circulación de genotipos del virus de la rubéola en España entre los años 1998 y 2009 (objetivos 2 y 3).

La caracterización del genotipo del RUBV está incluida en los protocolos de vigilancia epidemiológica de los planes de eliminación como un componente esencial, ya que ayuda a distinguir entre transmisión endémica e importación del virus, cuando se dispone de suficientes casos y de una perspectiva temporal adecuada, indentificando la interrupción de la transmisión endémica de este virus, y siendo un indicador relevante del estadio de eliminación (6, 10, 186, 193, 195). Además, puede permitir establecer relaciones entre casos que ocurren simultáneamente en diferentes localidades o países y confirmar los datos epidemiológicos en cuanto a la fuente de importación o sugerirlas en ausencia de estos, monitorizando la vía de transmisión, todo lo cual, es de máxima relevancia para el estudio y el manejo de brotes individuales (10, 99, 110). Finalmente, permite también confirmar casos postvacunales [Sección 5.3 de Resultados] (120). Por todo esto, la OMS ha normalizado los métodos de genotipificado indicando cual es la región del genoma donde debe trabajarse y las cepas de referencia de cada uno de los genotipos, identificando dos grupos (clados 1 y 2) que se diferencian por 8% a 10% a nivel de nucleótidos (193, 195). La elección del fragmento genómico utilizado en este trabajo ha seguido el criterio internacional al ser la única manera reconocida hasta ahora, de poder poner nuestros resultados en un contexto global. El uso de la secuenciación genómica ha contribuido al entendimiento de la diversidad genética y rutas de transmisión del RUBV, y es considerada importante para la actividad de control y eliminación de este patógeno en el mundo (10, 178). En este

trabajo, no se ha detectado ninguna secuencia no tipificable, con lo que ha bastado la secuencia parcial del gen E1 para resolver todos los casos y asignarles un genotipo determinado. A causa de la baja incidencia de rubéola durante los años de elaboración de esta tesis y del poco rendimiento obtenido en la amplificación de ARN de RUBV sobre sueros de colección, no se ha podido tener oportunidad de genotipar un gran número de casos, a diferencia de lo ocurrido con sarampión (124). Por ello, es difícil definir un modelo de circulación del virus. Durante este período de estudio (1998 a 2009), el análisis filogenético de las secuencias españolas mostró la circulación de 5 de los 13 genotipos del RUBV (1a, 1E, 1j, 1i y 2B) (Figura 37), tanto en casos esporádicos; como en pequeñas agrupaciones de casos, por ejemplo el pequeño brote ocurrido en Madrid en el 2003 (11 casos) y Algeciras-Cádiz en el 2008 (18 casos) por los genotipos 1E y 2B, respectivamente; o en brotes de varios cientos de casos como el ocurrido también en Madrid entre el 2004/2005 por el genotipo 1j (1, 110, 122). Los datos, muestran la exclusiva presencia inicial de uno de ellos, el genotipo 1E, con aparente reemplazo posterior por el genotipo 2B y un gran brote por 1j en 2005. Todo ello, sugiere un patrón de importaciones esporádicas sin establecimiento de una circulación endémica por ningún genotipo (Figura 37 y Tabla 11). Este patrón es consistente con el bajo número de casos de rubéola detectados durante estos años (Tabla 7) y con la observación de diversos períodos de tiempo libres de casos, de duración superior al período de incubación de la enfermedad (133), hechos que también apoyan la hipótesis de la carencia de circulación autóctona y de una situación próxima a la eliminación de la enfermedad consistente con el objetivo de conseguirlo para el 2015 (147). Aunque, como se ha comprobado, la existencia de bolsas locales de adultos susceptibles, nacionales e inmigrantes, y el hecho de que los niños menores de 12 meses no estén vacunados en la mayoría de las CCAA (115), continuarán permitiendo la aparición de casos, e incluso de brotes autolimitados hasta que la eliminación se amplíe al resto del mundo. Los orígenes de importación de casos de rubéola parecen haber sido, pues, diversos, aunque no se han podido definir en la mayoría de los casos analizados, pero por encima de todos destaca Europa. El primer caso

detectado en este periodo de estudio (1998 a 2009) fue en un niño de 15 días de edad con SRC en Santa Cruz de Tenerife-Canarias en 1998, por el genotipo 1E, infectado por una cepa muy próxima a una portuguesa y una francesa del mismo año y concordante con los datos bibliográficos sobre circulación simultánea de este genotipo en Francia (178). Se volvió a detectar este mismo genotipo en un brote de Madrid del 2003 que afectó a 11 casos entre personas inmigrantes adultas de origen latinoamericano (153). Las cepas aparecen próximas a las mismas anteriores y a una cepa italiana del año 97 y coincidió con el que circuló en Europa y otras áreas geográficas para este mismo periodo, incluyendo Marruecos (26, 178, 199, 201). Sin embargo, el genotipo 1E solo ha sido detectado en América en los años 1997 y 1998, sin que se haya encontrado posteriormente, por lo que nos inclinamos a pensar que el origen más probable de este brote fue europeo a pesar de afectar a población latinoamericana. Finalmente, este genotipo deja de detectarse en España, hasta que un caso esporádico fue detectado en Málaga en el 2009, de origen desconocido. Al igual que en años anteriores, este genotipo también fue detectado en esta época en múltiples países, incluyendo varios europeos, por lo que es difícil de establecer su origen concreto (9, 10, 64, 90, 95, 178, 199, 201, 202) (Tabla 17; Figuras 44 y 45).

El siguiente brote analizado, ocurrió también en Madrid entre 2004 y 2005, de origen desconocido y afectó a 460 personas (1, 110, 122) también predominantemente de origen latinoamericano. Las cepas causantes de este brote fueron asignadas al genotipo 1j a diferencia de las del anterior. Afectó principalmente a una población no vacunada de latinoamericanos y varones españoles (1), nacidos antes de la introducción de la vacuna TV (SRP) a principio de los años 80 (1) y que no fueron inmunizados en las campañas previas centradas únicamente en niñas de 11 años, siendo ésta la razón de la menor incidencia en mujeres nacidas en España para esta fecha (1, 110). Por ser el caso índice desconocido, el origen geográfico del brote también lo es, por lo que, de nuevo, surge la duda de si es europeo o americano. El genotipo 1j no había sido detectado en Europa hasta este brote. Los datos concernientes a la circulación de los genotipos en Europa durante estos años mostraron que los genotipos circulantes fueron 1E, 1G, 2B y 1D, este

último importado de Filipinas (10, 64, 87, 93, 178). Los genotipos 1E y 1G circularon en Bielorusia entre el 2004 y 2005 (10, 87, 186), y además, el genotipo 1E circuló en Polonia en el 2007 (10, 109), en Gran Bretaña (10, 93) y en Francia, donde se detectó durante dos años con alta incidencia de RUBV en mujeres embarazadas, 1997 y 2000 (10, 178). Finalmente, los genotipos 2B y 1D circularon en Gran Bretaña en el 2004, 2006, 2007, 2008 y 2010 (10, 93). Además, el genotipo 2B circuló en España en el 2008, Italia 2008 (10), Francia 2009 (10), y Bosnia y Herzegovina 2009 y 2010 (10). Consecuentemente con lo expuesto anteriormente, los datos presentados en este trabajo y publicados por Martínez-Torres *et al.* (2009) (110), son los primeros datos que se conocen de la detección y aislamiento del genotipo 1j en Europa. Además, trabajos recientes acerca de la circulación del RUBV en África en el 2007, muestran la presencia de los genotipos 1E en Marruecos, 1G en Uganda y Costa de Marfil, y 2B en Sudáfrica (10, 26), por lo tanto, África o más específicamente Marruecos, que es el país más próximo a España, tampoco parece haber sido la fuente de este brote. En cualquier caso, Marruecos no parece ser una fuente tan frecuente de importación como cabría esperar habida cuenta de los intensos movimientos de población que se producen entre este país y España. La mayoría de las secuencias publicadas del genotipo 1j provienen de Japón y Filipinas (10, 195) pero nosotros no contamos con ninguna evidencia epidemiológica que una el brote de España con esta parte del mundo ya que, aunque se detectaron dos casos en el brote de personas de China y Filipinas, ninguno de ellos fue el caso índice y la mayoría de los demás casos son población latinoamericana. Aunque, el genotipo prevalente que circuló en Latinoamérica para el mismo año y los anteriores corresponde al genotipo 1C (10, 186), el genotipo 1j circuló ese mismo año en Brasil (160) y la cepa que lo hizo es la más parecida a la que causó el brote en Madrid, alcanzando la identidad absoluta (100%) con algunas de las cepas. Considerando en su conjunto todos estos datos, el origen geográfico más probable para este brote creemos que sería Latinoamérica, área en la que pudo haber circulación de este genotipo más allá de Brasil. Sin embargo, en la publicación original (110) no se llegó a esta conclusión, ya que en el momento de redactarla no

existía ningún precedente de circulación de genotipo 1j en América, ni estaban disponibles las secuencias brasileñas. Este hecho ilustra la enorme importancia de trabajos como éste, que generan datos que son esenciales para aprovechar el potencial del genotipado como herramienta epidemiológica en la resolución de brotes.

Adicionalmente a las cepas de este brote, se detectó otra (1897F05), en un caso esporádico de Sevilla muy similar a las del bote de Madrid, proveniente de un caso esporádico detectado en Sevilla (Andalucía) en el mismo año del brote y que podría estar relacionado. Finalmente, la cepa 1854F07 proveniente de un caso esporádico que circuló en Barcelona (Cataluña) en el 2007, es más parecida a cepas 1j de origen asiático y es en cualquier caso diferente de la que circuló en 2005 en Madrid, lo cual sugiere que proviene de un evento de importación posterior diferente desde una localización desconocida, habida cuenta de que las dos secuencias más parecidas provienen de Japón y Canadá (10).

El último brote de RUBV incluido en este estudio, ocurrió en Algeciras-Cádiz (Andalucía) en el 2008, fue producido por el genotipo 2B, su origen es desconocido y afectó a 18 individuos. Su origen es difícil de establecer, habida cuenta de que existe constancia de la circulación de este genotipo en muchas partes del mundo, siendo el predominante en Europa. Así, ni los árboles filogenéticos ni los datos de homología permiten aproximar las cepas de este brote a ninguna en concreto de las que se agrupan en la misma rama y que incluyen lugares tan distantes como China, Vietnam, Japón, Argentina, Brasil, EEUU, Bosnia-Herzegovina, Inglaterra o Francia. No existe información sobre genotipos de rubéola en Marruecos, conectado por barco con Algeciras, más allá de la presencia de 1E en 2004. Resulta destacable que este brote, fue detectado en el contexto de otro del MeV, siendo los resultados de laboratorio los que permitieron detectarlo, ya que habría pasado inadvertido con un diagnóstico meramente clínico de los casos (112). Esto viene a ilustrar la importancia del laboratorio en la vigilancia epidemiológica de los exantemas víricos vacunables y en particular el papel de las técnicas múltiples de detección de genomas. Únicamente la secuencia 2B amplificada de la muestra 3819F06 (caso esporádico de año diferente al

año del brote) se situó en otra rama junto con la cepa JQ413980/Kamur.IND/9.09 de India, la cual, por otra parte, no es la que presenta mayor porcentaje de homología con ella, por lo que no creemos que la asociación sea suficientemente significativa como para atribuirle este origen geográfico.

En consecuencia, únicamente en el caso del brote por genotipo 1j se produjo una concurrencia de datos filogenéticos y epidemiológicos que permiten aventurar un origen en Latinoamérica. Esto es más difícil para 1E y 2B, genotipos mucho más extendidos, aunque su presencia concomitante en Europa nos inclina a pensar en que este pueda ser el origen de importación más probable, más aún cuando sabemos que Europa es el origen de importación más frecuente del sarampión en España (126).

Por tanto, es necesario un esfuerzo adicional considerable en el genotipado del RUBV en todo el mundo para obtener suficientes secuencias y datos disponibles que permitan llegar a conclusiones coherentes acerca de la circulación mundial del RUBV y así como asignar el origen geográfico de brotes basándose en los genotipos circulantes, tal y como es el caso del virus del sarampión en Europa (99).

Variabilidad de RUBV en el contexto de brotes (Objetivo 3).

Las proporciones de mutaciones sinónimas y no sinónimas observadas durante los brotes, son similares a las reportadas por otros autores (23, 71, 86, 87, 148), confirmando que el RUBV es muy estable comparado con algunos alfavirus y otros virus ARN, como el virus de la polio y el VIH (34, 68, 96, 180). A pesar de que se ha observado la aparición de diversas mutaciones no sinónimas que, en ocasiones, afectan a localizaciones que tienen asignadas funciones, no parece observarse ningún fenómeno de selección positiva, ya que ninguna mutación parece imponerse tras su aparición en ninguno de los brotes, lo cual está de acuerdo con la estabilidad atribuida al RUBV. No obstante, se requieren estudios adicionales sobre las propiedades biológicas y más específicamente, del grado de neutralización de las cepas que tuvieron variación de aa en sitios inmunoreactivos del gen E1, por anticuerpo inducido por la vacuna.

El número de variaciones de secuencia acumulada durante los brotes de 1j y 2B resultó excesivo de acuerdo a la tasa de mutación de $1,65 \times 10^{-3}$ variaciones/posición/año de este mismo fragmento genómico calculada por Zhu *et al.* (2010) (201) para el genotipo 1E en China. Según esta tasa, debería esperarse 1,2 variaciones por año, muy lejos de las observadas en ambos brotes que solo se explicarían con tasas de evolución diez veces más altas (Tabla 22).

Tabla 22. Variaciones encontradas en brotes de más de cien casos y de menos de veinte casos en relación a la posición nucleotídica y al ciclo de replicación. Los cálculos de la variabilidad han sido: número de mutaciones encontradas en un brote dividido por el número de nucleótidos analizados (739) y posteriormente la cantidad obtenida se dividió por la duración del brote (número de días de duración del brote/365).

Brote	Año	Genotipo	Nº de Casos		% Secuenciados	Días(a)	Mut(b)	Variabilidad (c)
			Total	Secuenciados				
Madrid	2005	1j	468	41	8,7	333	9	$1,28 \times 10^{-2}$
Cádiz	2008	2B	18	18	100	79	5	$3,08 \times 10^{-2}$

a. Días de duración del brote. b. Número de mutaciones. c. Variaciones/posición/año.

Infección neurológica grave causada por el genotipo inactivo 1i de RUBV (Objetivo 3)

De todos los hallazgos sobre presencia de genotipos de rubéola en España recogidos en este estudio el más sorprendente resultó ser el de un caso por genotipo 1i detectado en 2008 en Guadalajara, ya que este genotipo se considera inactivo (10). Las únicas referencias a su circulación son en Europa (Alemania, Inglaterra, Italia) entre 1986 y 1994, no habiéndose detectado con posterioridad (71, 199).

El virus se identificó en una paciente del Hospital de Guadalajara, de 24 años con agammaglobulinemia policlonal autosómica recesiva como enfermedad de base y con infección respiratoria crónica pendiente de un trasplante pulmonar. Las secuencias se obtuvieron, una directamente de la muestra de LCR y dos del exudado faríngeo, de muestra directa y de

aislamiento viral (Figuras 46 y 47). La cepa 921I08, detectada en LCR, presentó ocho variaciones nucleotídicas, con respecto a la cepa 1151I08.seq, detectada en exudado faríngeo y diez con respecto al aislado de exudado faríngeo (Tabla 19). Todas las variaciones afectaron el tercer nucleótido del codón, permaneciendo silentes, sin producir cambios de aa. Las ocho diferencias observadas entre las variantes detectadas en exudado faríngeo y LCR de este mismo paciente son casi las mismas generadas a lo largo de un año durante un brote de varios cientos de casos como el de Madrid 2004/2005 (Tablas 13 y 22). Estas diferencias de secuencia entre muestras del mismo paciente sugieren la existencia de una población heterogénea, habiéndose seleccionado variantes al azar tras el tránsito entre compartimentos, o habiéndose generado de manera independiente en cada uno de ellos por aislamiento. Dado que las variaciones son sinónimas, no es esperable ningún tipo de ventaja adaptativa que haya podido guiar la selección. Cualquiera de las dos explicaciones requeriría de un tiempo mucho mayor del transcurrido entre ambas muestras y apunta hacia el establecimiento de una infección persistente en la paciente en algún momento pasado. Este hecho explicaría la presencia de un genotipo europeo extinto como el 1i, detectado por última vez en 1994 en países de nuestro entorno (Italia, Francia, Alemania), aunque, de acuerdo a la tasa mencionada, tasa de mutación de $1,65 \cdot 10^{-3}$ variaciones/posición/año, se necesitarían unos seis años y medio para generar ocho variaciones en fragmento analizado, lo cual nos retrotraería al momento en que se detectó por última vez. Quizás este genotipo circulase con posterioridad a 1994 sin ser detectado. Por otra parte, la tasa de mutación que hemos aplicado, se describió en un estudio sobre circulación del virus en China, contexto totalmente diferente del de la infección en un mismo paciente, en el que dicha tasa podría ser más lenta. La persistencia de la infección en la paciente podría explicarse a través de su estatus inmunológico. Su mala evolución se explica, además, por la concurrencia de un cuadro respiratorio crónico severo.

Las encefalitis por RUBV son raras y se estima que ocurren en 1:6.000 casos de rubéola (40, 65, 77). Mucho menos frecuentes son los casos de infección

neurológica persistente por RUBV. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se aísla e identifica este genotipo de RUBV asociado a un caso de infección neurológica en el mundo.

Infecciones por virus vacunal RA27/3 (genotipo 1a) (Objetivo 3).

Durante el estudio se ha detectado la cepa vacunal RA27/3 en tres casos diferentes, ninguno de los cuales tenía antecedentes recientes de vacunación. La secuencia es la misma que la obtenida de vacunas comercializadas en España. En un trabajo anterior, tras analizar por PCR múltiple de virus exantemáticos muestras de exudado faríngeo de 26 niños vacunados con vacuna triple vírica, tomadas entre los días 10 y 14 post-vacunación (120) se detectó virus vacunal RA27/3 en tres de ellos, uno de los cuales pudo recuperarse en cultivo. En ninguno de los niños se detectó el MeV o virus de la parotiditis. Estos antecedentes mostraban evidencias de excreción asintomática de RA27/3 tras vacunación, mientras que los tres casos de nuestro estudio sugerirían, además, la posibilidad de transmisión secundaria.

Resulta llamativo que dos de estos pacientes sean inmunodeprimidos (no hay datos del tercero), una niña de 14 años VIH positiva con exantema y un niño con leucemia transplantado. En este último caso, se pudo detectar el virus en ocho muestras diferentes. A diferencia del caso descrito anteriormente por genotipo 1i, la secuencia de dos de las cepas fueron idénticas presentando la tercera una única variación, con lo que parece que la infección es reciente. El paciente desarrolló múltiples complicaciones clínicas [diarrea, cistitis hemorrágica, fallo hepático y disminución de consciencia coincidente con resultado positivo a RUBV (genotipo 1a)]. Aunque resulta aventurado achacar dicha sintomatología al RUBV vacunal en ausencia de otras evidencias, su causalidad tampoco puede excluirse. En conclusión, este estudio aportaría las primeras evidencias de transmisión secundaria de RUBV vacunal a pacientes inmunodeprimidos con posibles implicaciones clínicas.

Desarrollo de la técnica de inmunodetección de proteínas mediante transferencia a membranas sintéticas (*Western-Blotting*: WB) y caracterización de la respuesta inmune (Objetivo 4).

Después de una búsqueda exhaustiva en la literatura, se observó que no existía experiencia en el uso de la caracterización de la respuesta inmune frente a proteínas individuales para la determinación de la especificidad de reacciones positivas a IgM de rubéola. Por esta razón se decidió hacer un estudio de *Western-Blot* en sueros de pacientes con diferentes patrones serológicos a rubéola, incluyendo el ensayo de avidéz de IgG que es el que actualmente se viene utilizando para confirmar resultados de IgM como asociados a infección aguda por RUBV. Sin embargo, después de analizar los resultados presentados en las Tablas 20 y 21, no se han podido establecer asociaciones significativas entre patrones serológicos, compatibles o no con infección aguda por RUBV y patrones de *Western-Blot* frente a PE. Por esta razón, esta aproximación metodológica no parece aportar nada a la determinación de avidéz de anticuerpos de clase IgG.

CONCLUSIONES

1. La inclusión del agente reductor betaína 5 M en la técnica de PCR anidada múltiple para RUBV, MeV y B19V, mejoró en cuatro logaritmos la sensibilidad con respecto a RUBV logrando un incremento en la detección del 42,4% en muestras clínicas de exudado faríngeo, 24,2% en suero y 37,4% en orina. También se observó un aumento en la intensidad de las bandas amplificadas para el MeV y especialmente, para el B19V. En consecuencia, se ha mejorado la eficiencia diagnóstica de la técnica, siendo la detección de genomas el marcador de mayor rendimiento para el diagnóstico de infecciones por RUBV, aunque solamente su combinación con detección de IgM específica permite obtener el máximo rendimiento.
2. Se han detectado cinco genotipos diferentes del RUBV (1E, 1j, 2B, 1i y 1a) en España entre los años 1998 y 2009 sin que se haya podido detectar circulación continua de ninguno de ellos. Este patrón concuerda con los datos de prevalencia de la enfermedad y de coberturas vacunales y sugiere la interrupción de la circulación autóctona del virus.
3. El origen geográfico de las cepas importadas del RUBV está de acuerdo con lo esperable a tenor de los movimientos de población acaecidos en España durante el periodo de estudio. Así que, los genotipos más frecuentemente encontrados, 1E y 2B, fueron, posiblemente, importados de Europa, aunque para 2B es difícil de precisar, dada su mayor ubiquidad. Sin embargo, el mayor brote declarado durante el estudio fue por genotipo 1j y su origen fue previsiblemente latinoamericano, coincidiendo con la población afectada mayoritariamente.
4. El estudio continuado de los genotipos implicados en episodios de importación parece reflejar la dinámica de cambio en los genotipos predominantes en los lugares de origen. Así, la mayor frecuencia de 1E observada entre 1998 y 2003 coincidió con lo reportado en otros países europeos y su reemplazo por 2B durante los últimos años coincidió con su detección en múltiples países del mundo. Finalmente, la aparición de

1j en población latinoamericana de Madrid en 2005 coincidió con su circulación en Brasil.

5. La detección de un caso de infección neurológica por genotipo 1i pareció deberse a una infección adquirida en el pasado y mantenida de forma persistente en una paciente inmunodeprimida, a tenor de las variaciones de secuencia observadas en cepas detectadas en diferentes compartimentos y de que no había noticia de la circulación de este genotipo desde el año 1994, considerándose inactivo.
6. La infección por virus vacunal RA27/3 detectada en tres pacientes sin antecedentes de vacunación, sugiere transmisión secundaria a partir de una persona vacunada sin identificar. Dos de los casos eran personas inmunodeprimidas, lo que podría explicar la presencia de síntomas clínicos asociados.
7. Los patrones de respuesta inmune a proteínas individuales del RUBV medidos por la técnica de *Western-Blot*, no tuvieron correlación con la aidez de IgG ni permitieron distinguir reactividades de IgM específicas e inespecíficas, por lo que no parecen tener utilidad como marcador diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. 2005. Brote Comunitario de Rubéola en la Población Residente en la Comunidad de Madrid. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid **11**:33-53.
2. 1999. Calendario vacunal 1999. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid **4**:50-9.
3. 1999, posting date. Guidelines for surveillance of congenital rubella syndrome and rubella, field test version [Online.]
4. 2002. III Encuesta de Serovigilancia de la Comunidad de Madrid. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid **8**:3-43.
5. 1996. Nuevo Calendario Vacunal. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid **19**:25-7.
6. 2005. Progress towards elimination of measles and prevention of congenital rubella infection in the WHO European Region, 1990-2004. Wkly Epidemiol Rec **80**:66-71.
7. **00.050.1**, posting date. Parvovirinae. <http://phene.cpmc.columbia.edu/ICTVdB/WWW/0501SFAM.htm>. [Online.]
8. **Abernathy, E., C. Cabezas, H. Sun, Q. Zheng, M. H. Chen, C. Castillo-Solorzano, A. C. Ortiz, F. Osore, L. Oliveira, A. Whittembury, J. K. Andrus, R. F. Helfand, y J. Icenogle.** 2009. Confirmation of rubella within 4 days of rash onset: comparison of rubella virus RNA detection in oral fluid with immunoglobulin M detection in serum or oral fluid. J Clin Microbiol **47**:182-8.
9. **Abernathy, E., M. H. Chen, J. Bera, S. Shrivastava, E. Kirkness, Q. Zheng, W. Bellini, y J. Icenogle.** 2013. Analysis of whole genome sequences of 16 strains of rubella virus from the United States, 1961-2009. Virol J **10**:32.
10. **Abernathy, E. S., J. M. Hubschen, C. P. Muller, L. Jin, D. Brown, K. Komase, Y. Mori, W. Xu, Z. Zhu, M. M. Siqueira, S. Shulga, N. Tikhonova, S. Pattamadilok, P. Incomserb, S. B. Smit, C. Akoua-Koffi, J. Bwogi, W. W. Lim, G. K. Woo, H. Triki, Y. Jee, M. N. Mulders, A. M. de Filippis, H. Ahmed, N. Ramamurty, D.**

- Featherstone, y J. P. Icenogle.** 2011. Status of global virologic surveillance for rubella viruses. *J Infect Dis* **204(Suppl 1)**:S524-32.
11. **Abzug, M. J.** 2004. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs* **6**:1-10.
 12. **Abzug, M. J., M. J. Levin, y H. A. Rotbart.** 1993. Profile of enterovirus disease in the first two weeks of life. *Pediatr Infect Dis J* **12**:820-4.
 13. **Ahumada-Ruiz, S., D. Flores-Figueroa, I. Toala-Gonzalez, y M. M. Thomson.** 2009. Analysis of HIV-1 pol sequences from Panama: identification of phylogenetic clusters within subtype B and detection of antiretroviral drug resistance mutations. *Infect Genet Evol* **9**:933-40.
 14. **Amela, C., y I. Pachón.** 2000. La Vigilancia Epidemiológica del sarampión en el contexto del "Plan de acción para eliminar el sarampión en España". *Boletín Epidemiológico Semanal* **8**:169-172.
 15. **Andrade, J. Q., C. A. Figueiredo, M. I. Oliveira, M. H. Carvalho, R. Schultz, y M. Zugaib.** 2011. Isolation and genotyping of rubella virus from a case of congenital infection in Brazil. *J Med Virol* **83**:2048-50.
 16. **Astell, C. R.** 1999. Parvoviruses (*Parvoviridae*). p. 1151-1158. In A. Granoff, Webster, R. G. (ed.), *Encyclopedia of Virology*, 2 ed, vol. 2. Academic Press, San Diego, California.
 17. **Atreya, C. D., K. V. Mohan, y S. Kulkarni.** 2004. Rubella virus and birth defects: molecular insights into the viral teratogenesis at the cellular level. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **70**:431-7.
 18. **Banatvala, J. E., y D. W. Brown.** 2004. Rubella. *Lancet* **363**:1127-37.
 19. **Beatch, M. D., J. C. Everitt, L. J. Law, y T. C. Hobman.** 2005. Interactions between rubella virus capsid and host protein p32 are important for virus replication. *J Virol* **79**:10807-20.
 20. **Berns, K., y C. R. Parrish.** 2007. Parvoviridae, p. 2437-2477. In D. M. Knipe, Howley, P. M. (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 2. Lippincott, Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health, Philadelphia, PA.

21. **Bloom, M. E., y N. S. Young.** 2001. Parvoviruses, p. 2361-2379. *In* D. M. Knipe, Howley, P. M. (ed.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
22. **Boeckh, M., y A. P. Geballe.** 2011. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* **121**:1673-80.
23. **Bosma, T. J., J. M. Best, K. M. Corbett, J. E. Banatvala, y W. G. Starkey.** 1996. Nucleotide sequence analysis of a major antigenic domain of the E1 glycoprotein of 22 rubella virus isolates. *J Gen Virol* **77**:2523-30.
24. **Bosma, T. J., K. M. Corbett, S. O'Shea, J. E. Banatvala, y J. M. Best.** 1995. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* **33**:1075-9.
25. **Brown, K. E., J. Mori, B. J. Cohen, y A. M. Field.** 1991. In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foetal liver culture. *J Gen Virol* **72**:741-5.
26. **Caidi, H., E. S. Abernathy, A. Benjouad, S. Smit, J. Bwogi, M. Nanyunja, R. El Aouad, y J. Icenogle.** 2007. Phylogenetic analysis of rubella viruses found in Morocco, Uganda, Cote d'Ivoire and South Africa from 2001 to 2007. *J Clin Virol* **42** 86-90.
27. **Calicó Bosch, I., y E. Navas Elorza.** 2006. Infecciones por adenovirus, p. 775-781. *In* V. Ausina Ruiz, Moreno Guillen, S. (ed.), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana, S. A., Madrid, España.
28. **Carlson, J., H. Artsob, M. Douville-Fradet, P. Duclos, M. Fearon, S. Ratnam, G. Tipples, P. Varughese, B. Ward, y J. Sciberras.** 1998. Measles surveillance: guidelines for laboratory support. Working Group on Measles Elimination. *Can Commun Dis Rep* **24**:33-44.
29. **Carnicer-Pont, D., I. Pena-Rey, V. M. de Aragon, F. de Ory, A. Dominguez, N. Torner, y J. A. Cayla.** 2008. Eliminating congenital rubella syndrome in Spain: does massive immigration have any influence? *Eur J Public Health* **18**:688-90.
30. **Casas, I., A. Avellon, M. Mosquera, O. Jabado, J. E. Echevarria, R. H. Campos, M. Rewers, P. Perez-Brena, W. I. Lipkin, y G. Palacios.**

2005. Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region. *J Clin Microbiol* **43**:6176-82.
31. **Casas, I., L. Powell, P. E. Klapper, y G. M. Cleator.** 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* **53**:25-36.
 32. **Cassinotti, P., G. Siegl, B. A. Michel, y P. Bruhlmann.** 1998. Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *J Med Virol* **56**:199-204.
 33. **CDC.** 1987. Rubella vaccination during pregnancy--United States, 1971-1986. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **36**:457-61.
 34. **Coffin, J. M.** 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**:143-64.
 35. **Cooray, S., L. Warrener, y L. Jin.** 2006. Improved RT-PCR for diagnosis and epidemiological surveillance of rubella. *J Clin Virol* **35**:73-80.
 36. **Corcioli, F., K. Zakrzewska, A. Rinieri, R. Fanci, M. Innocenti, R. Civinini, V. De Giorgi, S. Di Lollo, y A. Azzi.** 2008. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J Med Virol* **80**:2005-11.
 37. **Corcoran, A., y S. Doyle.** 2004. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J Med Microbiol* **53**:459-75.
 38. **Coughlan, S., J. Connell, B. Cohen, L. Jin, y W. W. Hall.** 2002. Suboptimal measles-mumps-rubella vaccination coverage facilitates an imported measles outbreak in Ireland. *Clin Infect Dis* **35**:84-6.
 39. **Craighead, J. E.** 2000. *Pathology and Pathogenesis of Human Viral Disease*, 1 ed. Academic Press, San Diego, California, USA.
 40. **Chantler, J., Wolinsky, J. S., y A. Tingle.** 2001. Rubella virus, p. 963-990. *In* B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P. M. (ed.), *Fields virology* 4rd ed, vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa

41. **Chaye, H., P. Chong, B. Tripet, B. Brush, y S. Gillam.** 1992. Localization of the virus neutralizing and hemagglutinin epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *Virology* **189**:483-92.
42. **Chaye, H. H., C. A. Mauracher, A. J. Tingle, y S. Gillam.** 1992. Cellular and humoral immune responses to rubella virus structural proteins E1, E2, and C. *J Clin Microbiol* **30**:2323-9.
43. **Chen, M. H., y J. P. Icenogle.** 2004. Rubella virus capsid protein modulates viral genome replication and virus infectivity. *J Virol* **78**:4314-22.
44. **Cheng, W. Y., H. C. Wang, M. T. Liu, y H. S. Wu.** 2013. Molecular surveillance of rubella viruses in Taiwan from 2005 to 2011. *J Med Virol* **85**:745-53.
45. **Chibo, D., M. A. Riddell, M. G. Catton, y C. J. Birch.** 2005. Applicability of oral fluid collected onto filter paper for detection and genetic characterization of measles virus strains. *J Clin Microbiol* **43**:3145-9.
46. **D'Agaro, P., G. Dal Molin, E. Zamparo, T. Rossi, M. Micuzzo, M. Buseti, D. Santon, y C. Campello.** 2010. Epidemiological and molecular assessment of a rubella outbreak in North-Eastern Italy. *J Med Virol* **82**:1976-82.
47. **Davidkin, I., M. Valle, H. Peltola, T. Hovi, M. Paunio, M. Roivainen, K. Linnavuori, S. Jokinen, y P. Leinikki.** 1998. Etiology of measles- and rubella-like illnesses in measles, mumps, and rubella-vaccinated children. *J Infect Dis* **178**:1567-70.
48. **Davison, A. J., M. Benko, y B. Harrach.** 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84**:2895-908.
49. **de Moraes, J. C., C. M. Toscano, E. N. de Barros, B. Kemp, F. Lievano, S. Jacobson, A. M. Afonso, P. M. Strebel, y K. L. Cairns.** 2011. Etiologies of rash and fever illnesses in Campinas, Brazil. *J Infect Dis* **204**(Suppl 2):S627-36.
50. **de Ory, F., J. Antonaya, M. V. Fernandez, y J. M. Echevarria.** 1993. Application of low-avidity immunoglobulin G studies to

- diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* **31**:1669-71.
51. **de Ory, F., I. Casas, C. J. Domingo, y J. Echevarria.** 1995. Application of fluoroimmunoassay to the identification of low avidity specific IgG against pathogenic human viruses and *Toxoplasma gondii*. *Clin Diagn Virol* **3**:323-32.
 52. **de Ory, F., y J. M. Echevarria.** 1989. Evaluación del criterio serológico para el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa *Enferm Infecc Microbiol Clin* **7**:485-8.
 53. **de Ory, F., J. C. Sanz, y I. M. Garcia Bermejo.** 2007. La vacuna triple vírica: viejos virus, nuevos problemas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**:227-9.
 54. **Demicheli, V., T. Jefferson, A. Rivetti, y D. Price.** 2005. Vaccines for measles, mumps and rubella in children. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004407.
 55. **Domingo, C., F. de Ory, J. C. Sanz, N. Reyes, J. Gascon, O. Wichmann, S. Puente, M. Schunk, R. Lopez-Velez, J. Ruiz, y A. Tenorio.** 2009. Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naive and flavivirus-vaccinated travelers. *Diagn Microbiol Infect Dis* **65**:42-8.
 56. **Dominguez, A., P. Plans, J. Costa, N. Torner, N. Cardenosa, J. Batalla, A. Plasencia, y L. Salleras.** 2006. Seroprevalence of measles, rubella, and mumps antibodies in Catalonia, Spain: results of a cross-sectional study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**:310-7.
 57. **Donadio, F. F., M. M. Siqueira, A. Vyse, L. Jin, y S. A. Oliveira.** 2003. The genomic analysis of rubella virus detected from outbreak and sporadic cases in Rio de Janeiro state, Brazil. *J Clin Virol* **27**:205-9.
 58. **Dorell, C. G., N. Jain, and D. Yankey.** 2011. Validity of parent-reported vaccination status for adolescents aged 13-17 years: National Immunization Survey-Teen, 2008. *Public Health Rep* **126(Suppl 2)**:60-9.

59. **Echavarria, M.** 2008. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* **21**:704-15.
60. **el Mubarak, H. S., M. W. Van De Bildt, O. A. Mustafa, H. W. Vos, M. M. Mukhtar, J. Groen, A. M. el Hassan, H. G. Niesters, S. A. Ibrahim, E. E. Zijlstra, T. F. Wild, A. D. Osterhaus, y R. L. De Swart.** 2000. Serological and virological characterization of clinically diagnosed cases of measles in suburban Khartoum. *J Clin Microbiol* **38**:987-91.
61. **EUVAC.NET.** 2010. Measles surveillance annual report 2010.
62. **EUVAC.NET.** 2009. Rubella surveillance report 2000-2007.
63. **Farng, K. T., K. G. Wu, Y. S. Lee, Y. H. Lin, y B. T. Hwang.** 2002. Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. *J Microbiol Immunol Infect* **35**:37-41.
64. **Feng, Y., S. Santibanez, H. Appleton, Y. Lu, y L. Jin.** 2011. Application of new assays for rapid confirmation and genotyping of isolates of rubella virus. *J Med Virol* **83**:170-7.
65. **Figueiredo, C. A., G. B. Klautau, A. M. Afonso, S. B. Castrignano, M. I. Oliveira, S. P. Curti, G. G. Squarcina, K. Narimatsu, Z. Rasslan, C. A. Lima, V. Golin, E. F. Tadeo, F. J. Spagunolo, B. Cataldo, y E. L. Durigon.** 2008. Isolation and genotype analysis of rubella virus from a case of Guillain-Barre syndrome. *J Clin Virol* **43**:343-5.
66. **Figueiredo, C. A., M. I. Oliveira, S. P. Curti, A. M. Afonso, A. L. Frugi Yu, F. Gualberto, y E. L. Durigon.** 2012. Phylogenetic analysis of rubella virus strains during an outbreak in Sao Paulo, 2007-2008. *J Med Virol* **84**:1666-71.
67. **Figueiredo, C. A., M. I. Oliveira, S. P. Curti, A. M. Afonso, A. L. Frugis Yu, J. Araujo, D. B. Oliveira, y E. L. Durigon.** 2012. Epidemiological and molecular characterization of rubella virus isolated in Sao Paulo, Brazil during 1997-2004. *J Med Virol* **84**:1831-8.

68. **Fitch, W. M.** 1996. The variety of human virus evolution. *Mol Phylogenet Evol* **5**:247-58.
69. **Fortuny Guash, C., y T. Pumarola Suñé.** 2006. Infecciones por enterovirus: virus coxsackie, echovirus y nuevos enterovirus, p. 893-901. *In* V. Ausina Ruiz, Moreno Guillén, S. (ed.), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
70. **Frey, T. K.** 1994. Molecular biology of rubella virus. *Adv Virus Res* **44**:69-160.
71. **Frey, T. K., E. S. Abernathy, T. J. Bosma, W. G. Starkey, K. M. Corbett, J. M. Best, S. Katow, y S. C. Weaver.** 1998. Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961-1997. *J Infect Dis* **178**:642-50.
72. **Frey, T. K., y J. S. Wollinsky.** 1999. Rubella Virus (*Togaviridae*), p. 1592-1601. *In* A. Cranoff, Webster, R. (ed.), *Encyclopedia of Virology*, vol. 3. Academic Press, San Diego, California, USA.
73. **Giessauf, A., T. Letschka, G. Walder, M. P. Dierich, y R. Wurznner.** 2004. A synthetic peptide ELISA for the screening of rubella virus neutralizing antibodies in order to ascertain immunity. *J Immunol Methods* **287**:1-11.
74. **Gomes Mde, L., L. L. Ferreira, R. H. Gomes, L. M. Lamarao, E. da Silveira, S. Rodrigues Lda, C. F. da Silva, y E. R. de Almeida.** 2007. RT-PCR for confirmation of echovirus 30 isolated in Belem, Brazil. *Braz J Infect Dis* **11**:403-6.
75. **Griffin, D. E.** 2007. Measles virus. p. 1551-1585. *In* D. M. Knipe, Howley, P. M. (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 2. Lippincott, Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health., Philadelphia, PA.
76. **Gubler, D. J., G. Kuno, y L. Markoff.** 2007. Flaviviruses., p. 1153-1252. *In* D. M. Knipe, Howley, P. M. (ed.), *Fields Virology.*, 5th ed, vol. 1. Lippincott, Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health., Philadelphia, PA.

77. **Guler, E., M. Davutoglu, S. Guler, D. Citirik, y H. Karabiber.** 2009. Encephalitis in a child during atypical course of rubella. *Infection* **37**:65-6.
78. **Gutierrez-Zufiaurre, N., J. Sanchez-Hernandez, S. Munoz, R. Marin, N. Delgado, M. C. Saenz, J. L. Munoz-Bellido, y J. A. Garcia-Rodriguez.** 2004. Seroprevalencia de anticuerpos anti *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, virus de la rubéola, virus de hepatitis B y C, y VIH en mujeres embarazadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**:512-6.
79. **Hall.** 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**:95-98.
80. **Hamkar, R., S. Jalilvand, M. H. Abdolbaghi, K. N. Jelyani, A. Esteghamati, A. Hagh-goo, T. Mohktari-Azad, y R. Nategh.** 2009. Distinguishing between primary infection and reinfection with rubella vaccine virus by IgG avidity assay in pregnant women. *East Mediterr Health J* **15**:94-103.
81. **Heegaard, E. D., y K. E. Brown.** 2002. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* **15**:485-505.
82. **Henke, W., K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr, y S. A. Loening.** 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **25**:3957-8.
83. **Hinman, A. R., B. S. Hersh, y C. A. de Quadros.** 1998. Rational use of rubella vaccine for prevention of congenital rubella syndrome in the Americas. *Rev Panam Salud Publica* **4**:156-60.
84. **Hirano, M., S. Nakamura, M. Okada, M. Ueda, y R. Mukai.** 2000. Rapid discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betaine. *J Clin Microbiol* **38**:1255-7.
85. **Ho-Terry, L., G. M. Terry, y P. Londesborough.** 1990. Diagnosis of foetal rubella virus infection by polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **71**:1607-11.

86. **Hofmann, J., M. Renz, S. Meyer, A. von Haeseler, y U. G. Liebert.** 2003. Phylogenetic analysis of rubella virus including new genotype I isolates. *Virus Res* **96**:123-8.
87. **Hubschen, J. M., M. Yermalovich, G. Semeiko, E. Samoilovich, E. Blatun, S. De Landtsheer, y C. P. Muller.** 2007. Co-circulation of multiple rubella virus strains in Belarus forming novel genetic groups within clade 1. *J Gen Virol* **88**:1960-6.
88. **Huelsenbeck, J. P., y F. Ronquist.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**:754-5.
89. **Hukic, M., J. M. Hubschen, M. Seremet, I. Salimovic-Besic, M. Mulaomerovic, N. Mehinovic, S. Karakas, E. Charpentier, y C. P. Muller.** 2011. An outbreak of rubella in the Federation of Bosnia and Herzegovina between December 2009 and May 2010 indicates failure to vaccinate during wartime (1992-1995). *Epidemiol Infect* **140**:447-53.
90. **Icenogle, J. P., T. K. Frey, E. Abernathy, S. E. Reef, D. Schnurr, y J. A. Stewart.** 2006. Genetic analysis of rubella viruses found in the United States between 1966 and 2004: evidence that indigenous rubella viruses have been eliminated. *Clin Infect Dis* **43(Suppl 3)**:S133-40.
91. **Icenogle, J. P., M. M. Siqueira, E. S. Abernathy, X. R. Lemos, R. A. Fasce, G. Torres, y S. E. Reef.** 2011. Virologic surveillance for wild-type rubella viruses in the Americas. *J Infect Dis* **204(Suppl 2)**:S647-51.
92. **Jawetz, E., Melnick, J. L., y E. A. Adelberg.** 1992. *Microbiología Médica*, 14 ed. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F.
93. **Jin, L., y B. Thomas.** 2007. Application of molecular and serological assays to case based investigations of rubella and congenital rubella syndrome. *J Med Virol* **79**:1017-24.
94. **Kalkan, I. H., y U. Dagli.** 2010. What is the most accurate method for the diagnosis of cytomegalovirus (CMV) enteritis or colitis? *Turk J Gastroenterol* **21**:83-6.

95. **Katow, S.** 2004. Molecular epidemiology of rubella virus in Asia: utility for reduction in the burden of diseases due to congenital rubella syndrome. *Pediatr Int* **46**:207-13.
96. **Kinnunen, L., T. Poyry, y T. Hovi.** 1992. Genetic diversity and rapid evolution of poliovirus in human hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**:49-61.
97. **Klein, N. P., B. Fireman, W. K. Yih, E. Lewis, M. Kulldorff, P. Ray, R. Baxter, S. Hambidge, J. Nordin, A. Naleway, E. A. Belongia, T. Lieu, J. Baggs, y E. Weintraub.** 2010. Measles-mumps-rubella-varicella combination vaccine and the risk of febrile seizures. *Pediatrics* **126**:e1-8.
98. **Knowles, N. J., T. Hovi, T. Hyypiä, A. M. Q. King, A. M. Lindberg, M. A. Pallansch, A.C. Palmenberg, P. Simmonds, T. Skern, G. Stanway, T. Yamashita, y R. Zell.** 2012. *Picornaviridae*, p. 855-880. In A. M. Q. King, Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. (ed.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego.
99. **Kremer, J. R., K. E. Brown, L. Jin, S. Santibanez, S. V. Shulga, Y. Aboudy, I. V. Demchyshyna, S. Djemileva, J. E. Echevarria, D. F. Featherstone, M. Hukic, K. Johansen, B. Litwinska, E. Lopareva, E. Lupulescu, A. Mentis, Z. Mihneva, M. M. Mosquera, M. Muscat, M. A. Naumova, J. Nedeljkovic, L. S. Nekrasova, F. Magurano, C. Fortuna, H. R. de Andrade, J. L. Richard, A. Robo, P. A. Rota, E. O. Samoilovich, I. Sarv, G. V. Semeiko, N. Shugayev, E. S. Utegenova, R. van Binnendijk, L. Vinner, D. Waku-Kouomou, T. F. Wild, D. W. Brown, A. Mankertz, C. P. Muller, y M. N. Mulders.** 2008. High Genetic Diversity of Measles Virus, World Health Organization European Region, 2005-2006. *Emerg Infect Dis* **14**:107-114.
100. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.

101. **Lake, A. M., B. A. Lauer, J. C. Clark, R. L. Wesenberg, y K. McIntosh.** 1976. Enterovirus infections in neonates. *J Pediatr* **89**:787-91.
102. **Lamond, D. W.** 2010. Review article: Safety profile of propofol for paediatric procedural sedation in the emergency department. *Emerg Med Australas* **22**:265-86.
103. **Law, L. M., J. C. Everitt, M. D. Beatch, C. F. Holmes, y T. C. Hobman.** 2003. Phosphorylation of rubella virus capsid regulates its RNA binding activity and virus replication. *J Virol* **77**:1764-71.
104. **Lee, B. E., R. Chawla, J. M. Langley, S. E. Forgie, M. Al-Hosni, K. Baerg, E. Husain, J. Strong, J. L. Robinson, U. Allen, B. J. Law, S. Dobson, y H. D. Davies.** 2006. Paediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of aseptic meningitis. *BMC Infect Dis* **6**:68.
105. **Lee, J. Y., y D. S. Bowden.** 2000. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin Microbiol Rev* **13**:571-87.
106. **Lemos, C., R. Ramirez, M. Ordobas, D. H. Guibert, J. C. Sanz, L. Garcia, y J. F. Martinez Navarro.** 2004. New features of rubella in Spain: the evidence of an outbreak. *Euro Surveill* **9**:9-11.
107. **Lumbreras Bermejo, C., y J. J. Rodríguez Otero.** 2006. Infecciones por el virus de Epstein-Barr., p. 759-768. *In* V. Ausina Ruiz, Moreno Guillén, S. (ed.), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana., Madrid.
108. **Mace, M., D. Cointe, C. Six, D. Levy-Bruhl, I. Parent du Chatelet, D. Ingrand, y L. Grangeot-Keros.** 2004. Diagnostic value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. *J Clin Microbiol* **42**:4818-20.
109. **Makowka, A., W. Gut, B. Litwinska, S. Santibanez, y A. Mankertz.** 2007. Genotyping of measles and rubella virus strains circulating in Poland in 2007. *Euro Surveill* **12**:E071025 2.
110. **Martinez-Torres, A. O., M. M. Mosquera, J. C. Sanz, B. Ramos, y J. E. Echevarria.** 2009. Phylogenetic analysis of rubella virus strains

- from an outbreak in Madrid, Spain, from 2004 to 2005. *J Clin Microbiol* **47**:158-63.
111. **Masa, J., T. Castellanos, y M. Terrés.** 2011. Informe Anual del Plan de Eliminación de la Rubéola y del Síndrome de Rubéola Congénita. España año 2010, p. 1-55. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica: Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. .
 112. **Masa, J., I. Peña-Rey, T. Castellanos, M. V. Martínez de Aragón, y E. Alcalde.** 2009. Informe Anual del Plan de Eliminación de la Rubéola y del Síndrome de Rubéola Congénita. España año 2008., p. 1-27. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica: Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.
 113. **Medici, M. C., M. Martinelli, V. Albonetti, C. Chezzi, y G. Dettori.** 2008. Evaluation of rubella virus immunoglobulin G (IgG) and IgM assays with the new Vidia instrument. *J Clin Microbiol* **46**:1847-9.
 114. **Mercader, S., D. Featherstone, y W. J. Bellini.** 2006. Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology. *J Virol Methods* **137**:140-9.
 115. **Ministerio de Sanidad, Servicio Social e Igualdad.** 2013, posting date. Calendario de Vacunación. [Online.]
 116. **Mitchell, L. A., T. Zhang, M. Ho, D. Decarie, A. J. Tingle, M. Zrein, y M. Lacroix.** 1992. Characterization of rubella virus-specific antibody responses by using a new synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **30**:1841-7.
 117. **Miyoshi, M., R. Komagome, H. Nagano, K. Takahashi, H. Koba, Y. Kaneko, Y. Watanabe, F. Suzuki, T. Hiroshima, I. Aida, S. Kitamura, N. Saji, R. Yamaguchi, y M. Okano.** 2012. An isolated incidence of rubella outbreak at a workplace in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* **65**:94-7.
 118. **Mocarski Jr., E. S.** 1999. Cytomegaloviruses (*Herpesviridae*), p. 344-351. In A. Granoff, Webster, R. G. (ed.), *Encyclopedia of Virology*, vol. 1. Academic Press, San Diego, California.

119. **Montejo Baranda, M., y K. Aguirrebengoa Ibarguren.** 2006. Infecciones por Parvovirus B19, p. 801-805. *In* V. Ausina Ruiz, Moreno Guillen, S. (ed.), Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, S. A., Madrid, España.
120. **Mosquera, M. del M.** 2010. Tesis de Doctorado: Desarrollo del diagnóstico molecular de virus exantemático. Epidemiología molecular del virus del Sarampión en España. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España.
121. **Mosquera, M. del M., F. de Ory, M. Moreno, y J. E. Echevarria.** 2002. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **40**:1111-6.
122. **Mosquera, M. del M., J. C. Sanz, J. E. Echevarria, N. Herranz, M. Fernandez, y F. de Ory.** 2006. Estudio del rendimiento diagnóstico de la detección de IgM específica y de la amplificación genómica de rubéola. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **24**:251-3.
123. **Mosquera, M. M., F. de Ory, V. Gallardo, L. Cuenca, M. Morales, W. Sanchez-Yedra, T. Cabezas, J. M. Hernandez, y J. E. Echevarria.** 2005. Evaluation of diagnostic markers for measles virus infection in the context of an outbreak in Spain. *J Clin Microbiol* **43**:5117-21.
124. **Mosquera, M. M., F. Ory, y J. E. Echevarria.** 2005. Measles virus genotype circulation in Spain after implementation of the national measles elimination plan 2001-2003. *J Med Virol* **75**:137-46.
125. **Norja, P., K. Hokynar, L. M. Aaltonen, R. Chen, A. Ranki, E. K. Partio, O. Kiviluoto, I. Davidkin, T. Leivo, A. M. Eis-Hubinger, B. Schneider, H. P. Fischer, R. Tolba, O. Vapalahti, A. Vaheri, M. Soderlund-Venermo, y K. Hedman.** 2006. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:7450-3.
126. **Novo, A., J. M. Huebschen, C. P. Muller, M. Tesanovic, y J. Bojanic.** 2009. Ongoing rubella outbreak in Bosnia and Herzegovina, March-July 2009--preliminary report. *Euro Surveill* **14**.

127. **O'Shea, S., S. Woodward, J. M. Best, J. E. Banatvala, H. Holzel, y J. A. Dudgeon.** 1988. Rubella vaccination: persistence of antibodies for 10-21 years. *Lancet* **2**:909.
128. **Odumade, O. A., K. A. Hogquist, y H. H. Balfour, Jr.** 2011. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* **24**:193-209.
129. **Organización Panamericana de la Salud.** 2006. A un paso de la eliminación de la rubéola y el síndrome de rubéola congénita. *Boletín de Inmunización* **28**:4-5.
130. **Page, R. D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**:357-8.
131. **Parkman, P. D.** 1996. Togaviridae: Rubella Virus. *In* S. Baron (ed.), *Medical Microbiology*, 4 ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, USA.
132. **Parsyan, A., C. Szmaragd, J. P. Allain, y D. Candotti.** 2007. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J Gen Virol* **88**:428-31.
133. **Peña-Rey, I., T. Castellanos, E. Alcalde, y J. Masa.** 2009. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión. España 2008. *Bol Epidemiol Semanal* **17**:85-92.
134. **Pérez Sáenz, J. L., y J. M. Cisneros Herreros.** 2006. Infecciones por citomegalovirus., p. 747-757. *In* V. Ausina Ruiz, Moreno Guillén, S. (ed.), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana., Madrid.
135. **Perry, R. T., y N. A. Halsey.** 2004. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis* **189**(Suppl 1):S4-16.
136. **Pham, V. H., T. V. Nguyen, T. T. Nguyen, L. D. Dang, N. H. Hoang, T. V. Nguyen, y K. Abe.** 2013. Rubella epidemic in Vietnam: characteristic of rubella virus genes from pregnant women and their fetuses/newborns with congenital rubella syndrome. *J Clin Virol* **57**:152-6.
137. **Plotkin, S. A.** 2001. Rubella eradication. *Vaccine* **19**:3311-9.

138. **Pozo Sánchez, F., y J. L. Prada Pardal.** 2006. Infecciones por herpesvirus humanos tipos 6, 7 y 8. Herpesvirus B., p. 769-774. *In* V. Ausina Ruiz, Moreno Guillén, S. (ed.), Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
139. **Ramsay, M., R. Brugha, y D. Brown.** 1997. Surveillance of measles in England and Wales: implications of a national saliva testing programme. *Bull World Health Organ* **75**:515-21.
140. **Ramsay, M., M. Reacher, C. O'Flynn, R. Buttery, F. Hadden, B. Cohen, W. Knowles, T. Wreghitt, y D. Brown.** 2002. Causes of morbilliform rash in a highly immunised English population. *Arch Dis Child* **87**:202-6.
141. **Rao, C. D., P. Yergolkar, y K. S. Shankarappa.** 2012. Antigenic diversity of enteroviruses associated with nonpolio acute flaccid paralysis, India, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* **18**:1833-40.
142. **Razonable, R. R., y C. V. Paya.** 2002. The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl* **8**:651-8.
143. **Reef, S. E., S. B. Redd, E. Abernathy, P. Kutty, y J. P. Icenogle.** 2011. Evidence used to support the achievement and maintenance of elimination of rubella and congenital rubella syndrome in the United States. *J Infect Dis* **204**(Suppl 2):S593-7.
144. **Revello, M. G., F. Baldanti, A. Sarasini, M. Zavattoni, M. Torsellini, y G. Gerna.** 1997. Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* **35**:708-13.
145. **Riddell, M. A., D. Chibo, H. A. Kelly, M. G. Catton, y C. J. Birch.** 2001. Investigation of optimal specimen type and sampling time for detection of measles virus RNA during a measles epidemic. *J Clin Microbiol* **39**:375-6.

146. **Robertson, S. E., D. A. Featherstone, M. Gacic-Dobo, y B. S. Hersh.** 2003. Rubella and congenital rubella syndrome: global update. *Rev Panam Salud Publica* **14**:306-15.
147. **Rota, P. A., y W. J. Bellini.** 2003. Update on the global distribution of genotypes of wild type measles viruses. *J Infect Dis* **187**(Suppl 1):S270-6.
148. **Saitoh, M., N. Shinkawa, S. Shimada, Y. Segawa, K. Sadamasu, M. Hasegawa, M. Kato, K. Kozawa, T. Kuramoto, O. Nishio, y H. Kimura.** 2006. Phylogenetic analysis of envelope glycoprotein (E1) gene of rubella viruses prevalent in Japan in 2004. *Microbiol Immunol* **50**:179-85.
149. **Saldanha, J., N. Lelie, M. W. Yu, y A. Heath.** 2002. Establishment of the first World Health Organization International Standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* **82**:24-31.
150. **Salud21.** 1999. El marco político de salud para todos de la Región Europea de la OMS. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
151. **Samuel, D., K. Sasnauskas, L. Jin, A. Gedvilaite, R. Slibinskas, S. Beard, A. Zvirbliene, S. A. Oliveira, J. Staniulis, B. Cohen, y D. Brown.** 2003. Development of a measles specific IgM ELISA for use with serum and oral fluid samples using recombinant measles nucleoprotein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Clin Virol* **28**:121-9.
152. **Sanchez-Fauquier, A., A. L. Carrascosa, J. L. Carrascosa, A. Otero, R. I. Glass, J. A. Lopez, C. San Martin, y J. A. Melero.** 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* **201**:312-20.
153. **Sanz, J. C., C. Lemos, D. Herrera, y R. Ramirez-Fernandez.** 2004. Brote de rubéola en población inmigrante de origen latinoamericano. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**:197.
154. **Sanz, J. C., M. Mosquera, B. Ramos, R. Ramirez, F. de Ory, y J. E. Echevarria.** 2010. Assessment of RNA amplification by multiplex RT-

- PCR and IgM detection by indirect and capture ELISAs for the diagnosis of measles and rubella. *Apmis* **118**:203-9.
155. **Sanz Moreno, J. C., L. Garcia Comas, R. Ramirez Fernandez, B. Ramos Blazquez, y M. Ordobas Gavin.** 2009. Evolución del sarampión, rubeola y parotiditis desde la III Encuesta de serovigilancia de la Comunidad de Madrid 1999-2000 (III ESVCM). *Rev Esp Salud Publica* **83**:625-37.
 156. **Schneider-Schaulies, S., y V. ter Meulen.** 1999. Measles Virus (*Paramixoviridae*). p. 952-960. In A. Granoff, Webster, R. G. (ed.), *Encyclopedia of Virology*. 2th ed, vol. 2. Academic Press, San Diego, California.
 157. **Servant-Delmas, A., J. J. Lefrere, F. Morinet, y S. Pillet.** 2010. Advances in human B19 erythrovirus biology. *J Virol* **84**:9658-65.
 158. **Servant, A., S. Laperche, F. Lallemand, V. Marinho, G. De Saint Maur, J. F. Meritet, y A. Garbarg-Chenon.** 2002. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol* **76**:9124-34.
 159. **Servey, J. T., B. V. Reamy, y J. Hodge.** 2007. Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician* **75**:373-6.
 160. **Siqueira, M. M., y X. R. Lemos.** 2009. Rubella E1 sequence. Laboratorio de Virus Respiratorios e do Sarampo, IOC, Fundacao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.
 161. **Smith, J. G., C. M. Wiethoff, P. L. Stewart, y G. R. Nemerow.** 2010. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* **343**:195-224.
 162. **Soderlund, M., R. von Essen, J. Haapasaari, U. Kiistala, O. Kiviluoto, y K. Hedman.** 1997. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* **349**:1063-5.
 163. **South, M. A., and J. L. Sever.** 1985. Teratogen update: the congenital rubella syndrome. *Teratology* **31**:297-307.
 164. **Srivastava, C. H., S. Zhou, N. C. Munshi, y A. Srivastava.** 1992. Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology* **189**:456-61.

165. **Syriopoulou, V. P., C. Hadjichristodoulou, G. L. Daikos, M. Pirounaki, V. Chatzicou, I. Pavlopoulou, M. Anagnostakou, M. Theodoridou, y H. Dellagrammaticas.** 2002. Clinical and epidemiological aspects of an enterovirus outbreak in a neonatal unit. *J Hosp Infect* **51**:275-80.
166. **Takami, T., S. Sonodat, H. Houjyo, H. Kawashima, Y. Takei, T. Miyajima, K. Takekuma, A. Hoshika, T. Mori, y T. Nakayama.** 2000. Diagnosis of horizontal enterovirus infections in neonates by nested PCR and direct sequence analysis. *J Hosp Infect* **45**:283-7.
167. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, y S. Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**:1596-9.
168. **Tanemura, M., K. Suzumori, Y. Yagami, y S. Katow.** 1996. Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction: a study of 34 cases diagnosed in fetuses. *Am J Obstet Gynecol* **174**:578-82.
169. **Tardieu, M., E. Dussaix, P. Lebon, y P. Landrieu.** 1986. Étude prospective de 59 meningites virales de l'enfant: diagnostic clinique et virologique. *Arch Fr Pediatr* **43**:9-14.
170. **Tenorio Matanzo, A., y M. Corachán Cuyás.** 2006. Infecciones por arbovirus y virus de fiebres hemorrágicas, p. 931-937. *In* V. Ausina Ruiz, Moreno Guillén, S. (ed.), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.
171. **Terry, G. M., L. Ho-Terry, P. Londesborough, y K. R. Rees.** 1988. Localization of the rubella E1 epitopes. *Arch Virol* **98**:189-97.
172. **Toan, N. L., A. Duechting, P. G. Kremsner, H. Song le, M. Ebinger, S. Aberle, V. Q. Binh, D. N. Duy, J. Torresi, R. Kandolf, y C. T. Bock.** 2006. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J Gen Virol* **87**:2941-9.

173. **Torner, N., L. Valerio, J. Costa, I. Parron, y A. Dominguez.** 2006. Rubella outbreak in young adults of Brazilian origin in a Barcelona suburb, October-December 2005. *Euro Surveill* **11**:E060223 3.
174. **Towbin, H., T. Staehelin, y J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
175. **Tran, D. N., M. P. Vu, M. T. Ha, T. P. Giang, K. Komase, M. Mizuguchi, y H. Ushijima.** 2011. Viral molecular characterization of the first congenital rubella syndrome case in Vietnam. *Clin Lab* **57**:397-401.
176. **Tzeng, W. P., J. D. Matthews, y T. K. Frey.** 2006. Analysis of rubella virus capsid protein-mediated enhancement of replicon replication and mutant rescue. *J Virol* **80**:3966-74.
177. **Valinotto, L. E., M. Viegas, M. E. Acevedo, P. R. Barrero, y A. S. Mistchenko.** 2009. Phylogenetic analysis of rubella viruses isolated in 2008 outbreak in Argentina. *J Clin Virol* **46**:286-9.
178. **Vauloup-Fellous, C., J. M. Hubschen, E. S. Abernathy, J. Icenogle, N. Gaidot, P. Dubreuil, I. Parent-du-Chatelet, L. Grangeot-Keros, y C. P. Muller.** 2010. Phylogenetic analysis of rubella viruses involved in congenital rubella infections in France between 1995 and 2009. *J Clin Microbiol* **48**:2530-5.
179. **Vyse, A. J., y L. Jin.** 2002. An RT-PCR assay using oral fluid samples to detect rubella virus genome for epidemiological surveillance. *Mol Cell Probes* **16**:93-7.
180. **Wain-Hobson, S.** 1993. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr Opin Genet Dev* **3**:878-83.
181. **Wandell, G.** 1999. Adenovirus, p. 1-30. *In* A. Granoff, Webster, R. G. (ed.), *Encyclopedia of Virology*, 2 ed, vol. 1. Academic Press, San Diego, California.
182. **Wang, C., Z. Zhu, Q. Xu, A. Xu, X. Fang, L. Song, W. Li, P. Xiong, y W. Xu.** 2013. Rubella epidemics and genotypic distribution of the rubella virus in Shandong Province, China, in 1999-2010. *PLoS One* **7**:e42013.

183. **Watson, J. C., S. C. Hadler, C. A. Dykewicz, S. Reef, y L. Phillips.** 1998. Measles, mumps, and rubella--vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella syndrome and control of mumps: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **47**:1-57.
184. **White, D. O., y F. J. Fenner.** 1994. *Medical Virology*, 4 ed. Academic Press, Inc, San Diego, California, USA.
185. **WHO** 2012, posting date. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection. WHO European Region strategic plan 2005–2010. [Online.]
186. **WHO.** 2006. Global distribution of measles and rubella genotypes--update. *Wkly Epidemiol Rec* **81**:474-9.
187. **WHO.** 2008. Measles and rubella laboratory network: 2007 meeting on use of alternative sampling techniques for surveillance. *Wkly Epidemiol Rec* **83**:229-32.
188. **WHO.** 2012. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec* **87**:73-81.
189. **WHO.** 2005. New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes. *Wkly Epidemiol Rec* **80**:347-51.
190. **WHO.** 2009. Progress toward measles elimination--European Region, 2005--2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**:142-5.
191. **WHO.** 2005. Progress towards elimination of measles and prevention of congenital rubella infection in the WHO European Region, 1990-2004. *Wkly Epidemiol Rec* **80**:66-71.
192. **WHO.** 2011. Rubella vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* **86**:301-16.
193. **WHO.** 2005. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Wkly Epidemiol Rec* **80**:126-32.
194. **WHO** 7 March 2005 2003, posting date. Strategic plan for measles and congenital rubella infection in the European Region of WHO. Copenhagen, WHO Regional Office For Europe. [Online.]

195. **WHO.** 2007. Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses, 2007. *Wkly Epidemiol Rec* **82**:216-22.
196. **Yang, T. T., L. M. Huang, C. Y. Lu, C. L. Kao, W. T. Lee, P. I. Lee, C. M. Chen, F. Y. Huang, C. Y. Lee, y L. Y. Chang.** 2005. Clinical features and factors of unfavorable outcomes for non-polio enterovirus infection of the central nervous system in northern Taiwan, 1994-2003. *J Microbiol Immunol Infect* **38**:417-24.
197. **Zheng, D. P., T. K. Frey, J. Icenogle, S. Katow, E. S. Abernathy, K. J. Song, W. B. Xu, V. Yarulin, R. G. Desjatskova, Y. Aboudy, G. Enders, y M. Croxson.** 2003. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerg Infect Dis* **9**:1523-30.
198. **Zheng, D. P., Y. M. Zhou, K. Zhao, Y. R. Han, y T. K. Frey.** 2003. Characterization of genotype II Rubella virus strains. *Arch Virol* **148**:1835-50.
199. **Zheng, D. P., H. Zhu, M. G. Revello, G. Gerna, y T. K. Frey.** 2003. Phylogenetic analysis of rubella virus isolated during a period of epidemic transmission in Italy, 1991-1997. *J Infect Dis* **187**:1587-97.
200. **Zhou, Y., H. Ushijima, y T. K. Frey.** 2007. Genomic analysis of diverse rubella virus genotypes. *J Gen Virol* **88**:932-41.
201. **Zhu, Z., E. Abernathy, A. Cui, Y. Zhang, S. Zhou, Z. Zhang, C. Wang, T. Wang, H. Ling, C. Zhao, Y. Chen, J. He, L. Sun, X. Chen, J. Tang, D. Feng, Y. Wang, Z. Ba, L. Fan, H. Chen, Z. Pan, J. Zhan, H. Chen, S. Zhou, L. Zheng, H. Gao, Y. Liang, D. Dai, J. Icenogle, y W. Xu.** 2010. Rubella virus genotypes in the People's Republic of China between 1979 and 2007: a shift in endemic viruses during the 2001 Rubella Epidemic. *J Clin Microbiol* **48**:1775-81.
202. **Zhu, Z., A. Cui, H. Wang, Y. Zhang, C. Liu, C. Wang, S. Zhou, X. Chen, Z. Zhang, D. Feng, Y. Wang, H. Chen, Z. Pan, X. Zeng, J. Zhou, S. Wang, X. Chang, Y. Lei, H. Tian, Y. Liu, S. Zhou, J. Zhan, H. Chen, S. Gu, X. Tian, J. Liu, Y. Chen, H. Fu, X. Yang, H. Zheng, L. Liu, L. Zheng, H. Gao, J. He, L. Sun, y W. Xu.** 2012. Emergence and continuous evolution of genotype 1E rubella viruses in China. *J Clin Microbiol* **50**:353-63.

203. **Zhu, Z., W. Xu, E. S. Abernathy, M. H. Chen, Q. Zheng, T. Wang, Z. Zhang, C. Li, C. Wang, W. He, S. Zhou, y J. Icenogle.** 2007. Comparison of four methods using throat swabs to confirm rubella virus infection. *J Clin Microbiol* **45**:2847-52.
204. **Zimmerman, L. A., M. Muscat, D. Jankovic, A. Goel, H. Bang, N. Khetsuriani, y R. Martin.** 2011. Status of rubella and congenital rubella syndrome surveillance, 2005-2009, the World Health Organization European Region. *J Infect Dis* **204(Suppl 1)**:S381-8.

ARTÍCULO

Phylogenetic Analysis of Rubella Virus Strains from an Outbreak in Madrid, Spain, from 2004 to 2005

A. O. Martínez-Torres, M. M. Mosquera, J. C. Sanz, B. Ramos and J. E. Echevarría
J. Clin. Microbiol. 2009, 47(1):158. DOI:
10.1128/JCM.00469-08.
Published Ahead of Print 19 November 2008.

Updated information and services can be found at:
<http://jcm.asm.org/content/47/1/158>

SUPPLEMENTAL MATERIAL	<i>These include:</i>
	Supplemental material
REFERENCES	This article cites 39 articles, 7 of which can be accessed free at: http://jcm.asm.org/content/47/1/158#ref-list-1
CONTENT ALERTS	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Phylogenetic Analysis of Rubella Virus Strains from an Outbreak in Madrid, Spain, from 2004 to 2005[†]

A. O. Martínez-Torres,^{1,3*} M. M. Mosquera,^{1,4} J. C. Sanz,² B. Ramos,² and J. E. Echevarría^{1,4}

Laboratorio de Aislamiento y Detección de Virus, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain¹; Laboratorio Regional de Salud Pública, Comunidad de Madrid, Madrid, Spain²; Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada, Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado, Universidad de Panamá, Panama City, Panama³; and CIBER en Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Barcelona, Spain⁴

Received 10 March 2008/Returned for modification 21 May 2008/Accepted 26 October 2008

An outbreak of rubella affected 460 individuals in 2004 and 2005 in the community of Madrid, Spain. Most of the patients were nonvaccinated Latin American immigrants or Spanish males. This study presents the first data on rubella virus genotypes in Spain. Forty selected clinical samples (2 urine, 5 serum, 3 blood, 2 saliva, and 28 pharyngeal exudate samples) from 40 cases were collected. The 739-nucleotide sequence recommended by the World Health Organization obtained from viral RNA in these samples was analyzed by using the MEGA v4.0 software. Seventeen isolates were obtained from 40 clinical samples from the outbreak, including two isolated from congenital rubella syndrome cases. Only viral RNA of genotype 1j was detected in both isolates and clinical specimens. Two variations in amino acids, G253C and T394S, which are involved in neutralization epitopes arose during the outbreak, but apparently there was no positive selection of either of them. The origin of the outbreak remains unknown because of poor virologic surveillance in Latin America and the African countries neighboring Spain. On the other hand, this is the first report of this genotype in Europe. The few published sequences of genotype 1j indicate that it comes from Japan and the Philippines, but there are no epidemiological data supporting this as the origin of the Madrid outbreak.

Rubella virus (RUBV) usually causes a mild exanthematous disease that is frequently accompanied by adenopathy and occasionally by arthralgia. Complications of this infection are rare and include encephalopathy and thrombocytopenia. However, the most severe consequence of this virus is its teratogenicity. It can cause congenital rubella syndrome (CRS) when it occurs in pregnant women, particularly during the first trimester of pregnancy (10).

The direct detection of RUBV RNA in clinical specimens, in addition to the detection of RUBV-specific immunoglobulin M, is a critical factor in the early laboratory diagnosis of recent or congenital infection (18, 27). Currently, the European region of the World Health Organization (WHO) aims to eliminate not only measles but also rubella and to reduce the incidence of CRS to less than one case per 100,000 live births by 2010 (38, 39). For this purpose, epidemiological surveillance based on the laboratory diagnosis of each suspected case and the characterization of the genotype of the circulating strains are included in the WHO's recommendations. In the most recent WHO update, the standard nomenclature for the classification and designation of wild-type RUBV strains recognizes nine definitive and four provisional genotypes (40), expanding the nomenclature established in 2005 (37), which was based on 739 nucleotides (nt) (nt 8731 to 9469) from the E1

gene sequence. This sequence encodes amino acids (aa) 159 to 404 (of the 481 aa) of the E1 glycoprotein. Although our knowledge of the geographic distribution of RUBV genotypes has grown substantially since 2003, the genotypes present in many countries and regions remain unknown (9), even though rubella is still recognized as a globally important disease in a general public health context (41). RUBV is considered monotypic with cross-neutralization among different genotypes.

In Spain, monovalent RUBV vaccine was introduced in the late 1970s, when it was administered in schools to 11-year-old girls (1). In 1981, one dose of the measles-mumps-rubella combined vaccine was introduced in the regular immunization schedule at the age of 15 months for all children. In 1996, a second dose at 11 years of age was introduced (5). In 1999, this second dose was given to 4-year-old children (3). Currently, the seroprevalence of RUBV in the community of Madrid exceeds 95% in all age groups and reaches 98.6% among women of childbearing age (16 to 45 years) (4). Nevertheless, the pattern is very different in other regions around the world and RUBV infection remains endemic in many areas, such as Latin America (15). The rubella vaccine was only introduced in Latin American countries in the late 1990s, so that many adult immigrants to Spain are not immunized. These circumstances led to a small outbreak in Madrid in 2003 (31) and a larger one in 2004 and 2005 (2, 27) among Latin American immigrants. The main aim of this study was to characterize the RUBV strain involved in the latter outbreak, which represents the first data concerning RUBV genotypes in Spain.

MATERIALS AND METHODS

Virus strains. The RA27/3 RUBV vaccine strain was used for standardization and as a positive control (Beecham, Madrid, Spain). Individual wild isolates of parainfluenza virus types 1, 2, 3, 4A, and 4B; adenovirus type 5; mumps virus;

* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Aislamiento y Detección de Virus, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km 2, Majadahonda (28220), Madrid, Spain. Phone: 34 918223682. Fax: 34 915097919. E-mail: amartinet13@hotmail.com.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://jcm.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 19 November 2008.

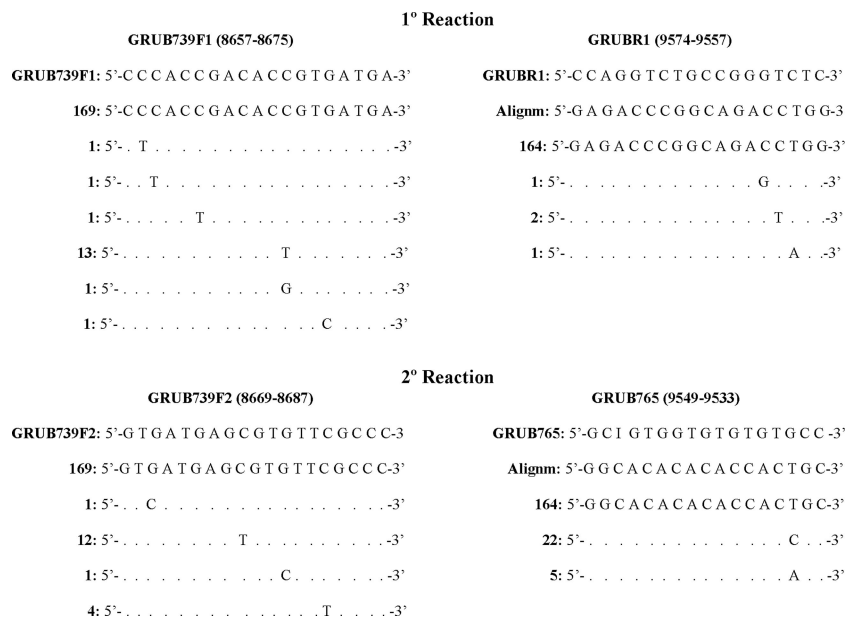


FIG. 1. RUBV primers. GRUB739F1 and GRUBR1 are first-reaction primers. GRUB739F2 and GRUB765 are second-reaction primers. The position of each primer following sequence L78917 {Rvi/PA.USA/64VAC[1a] (RA27/3)} is given. The band size obtained with the first reaction was 926 bp, and that for the nested reaction was 875 bp. Sequences used in the alignments were taken from GenBank on 25 September 2007. The number of sequences that are equal to our primer sequences is shown to the left of each illustrated primer.

respiratory syncytial virus types A and B; and eastern equine encephalitis virus (from the Instituto de Salud Carlos III collection) were used to evaluate the specificity of the reverse transcription (RT)-PCR assay used in this study.

Clinical samples. Forty selected clinical samples (2 urine, 5 serum, 3 blood, 2 saliva, and 28 pharyngeal exudate samples) collected from 40 infected people during an RUBV outbreak that occurred in the Madrid community in 2004 and 2005 were studied (see Table S2 in the supplemental material). The outbreak affected 460 people, especially nonvaccinated young Spanish men and Latin Americans, mostly Colombians and Ecuadorians (2). It lasted from week 40 of 2004 to week 35 of 2005. The 40 specimens analyzed were obtained from 10 local Spanish people, 21 immigrants, seven individuals of unknown origin, and two persons with CRS (1313A and 1358A) following the outbreak (GenBank accession numbers EU518617 and EU518618). They had an age range of 13 to 48 years (26.08 ± 6.50 [average ± standard deviation]) between weeks 40 of 2004 and 13 of 2005.

Specimens were collected and processed in accordance with WHO recommendations (39).

Isolation in cell culture. Isolation was performed as previously described (26), with Vero and fetal lung fibroblast cell lines. Inoculated tubes were monitored for a cytopathic effect (CPE) twice a week. After 7 days without a CPE, the culture supernatant was harvested and used to inoculate fresh monolayers. All tubes showing or not showing a CPE after the second passage (7 days) were monitored for the presence of RUBV by immunofluorescence assay with an RUBV-specific monoclonal antibody (mouse anti-rubella monoclonal antibody; Chemicon International, Inc., CA), followed by final immunostaining with fluorescein-labeled anti-mouse conjugate (anti-mouse immunoglobulin G-fluorescein isothiocyanate conjugate; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). Furthermore, cell supernatants were analyzed by multiplex RT-PCR for exanthematic viruses, including RUBV (26).

Primer design. Primers were designed to cover the window of 739 nt for the gene coding for E1 as recommended by the WHO (nt 8731 to 9469) (37). This gene sequence encodes aa 159 to 404 of the E1 glycoprotein. Genomic sequences of the RUBV E1 glycoprotein-encoding gene were taken from GenBank (September 2007) and aligned by the ClustalW method available in the BioEdit 7.0.9 and MEGA v4.0 (32) programs. Alignments were used for primer design (Fig. 1). The forward primer of the first reaction and the forward and reverse primers of the nested reaction were modified from the primer sequences provided by Joe Icenogle (Centers for Disease Control and Prevention Rubella Laboratory team leader), while the reverse primer of the first reaction was designed especially for the present work. Primers were synthesized by a commercial service (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).

RT and amplification. Total nucleic acids were extracted from samples by using the external lysis protocol on a MagNA Pure LC automatic extractor (Roche, Mannheim, Germany) for clinical specimens. Manual extraction (8) was used for cell culture supernatants. RT-PCR was performed with the Access RT-PCR System kit (Promega, Madison, WI). The extract was added to a PCR mixture composed of 2.5 mM MgSO₄, 500 μM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.5 μM each RUBV-specific first-reaction primer (Fig. 1), 10 μl of avian myeloblastosis virus-*Tfl* 5× reaction buffer, 5 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, 10 μl of betaine 5 M (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), and 5 U of *Thermus flavus* DNA polymerase (final volume of 50 μl). After the RT step of 45 min at 48°C and denaturation for 2 min at 94°C, the reaction mixtures were incubated for 30 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by 72°C for 5 min.

For nested reactions, 1 μl of the primary amplification products was added to 49 μl of a fresh PCR mixture containing 3 mM MgCl₂, 500 μM each dNTP, 1 μM each nested instead of primary reaction primer (Fig. 1), 5 μl of 10× PCR buffer II (Applied Biosystems, CA), 10 μl of betaine 5 M (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), and 0.25 U of *Taq* DNA polymerase (Applied Biosystems, CA). After denaturation for 2 min at 94°C, the reaction mixtures were incubated for 30 cycles of 94.7°C for 1 min, 57°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by 72°C for 5 min. The MgCl₂, dNTP, and primer concentrations were selected for both primary and nested amplifications on the basis of the results of standardization experiments and hybridization and denaturation temperatures. The PCR products were resolved on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The expected band size was 875 bp for RUBV.

Sequencing. PCR products were purified as described previously (28). Purified products were sequenced in both directions with a Big Dye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, CA) on an automatic sequencer (ABI Prism 3700 DNA sequencer; Applied Biosystems, Foster City, CA). The protocol incorporated betaine 5 M (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) to minimize failures associated with the GC-rich template. The nested PCR primers were used as sequencing primers. Sequencing was repeated in cases of nucleotide ambiguity.

Sequence analysis. Sequences were assembled with the SeqMan tool available in the Lasergene 7.0 program. The nucleotide sequences were aligned by the ClustalW method of BioEdit 7.0.9. Phylogenetic analysis was done with the MEGA v4.0 program (32), adopting the neighbor-joining Kimura two-parameter distance method for 1,000 replicates. It was based on the 739 nt of the E1 gene sequence, which is the minimum acceptable window defined by the WHO (37). Reference sequences (40) were included in each analysis.

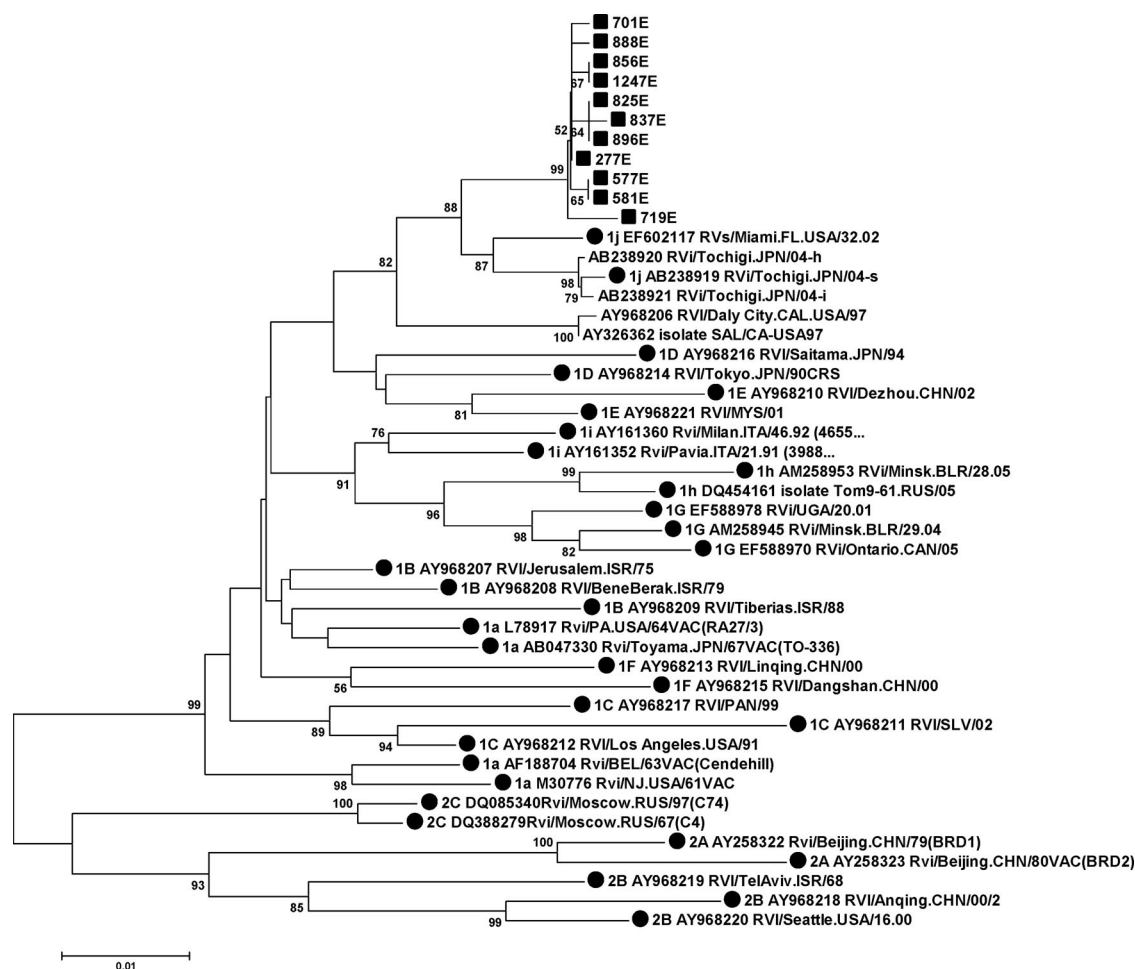


FIG. 2. Phylogenetic tree of the minimum acceptable window recommended by the WHO in the E1 gene. It shows the RUBV outbreak isolates and samples (■) in 2005 and all accepted reference strains, as well as sequences of the three provisional genotypes 1h, 1i, and 1j (●). Furthermore, it includes the other sequences from genotype 1j. The 277E sequence represents 75.0% (30 of 40) of the samples and isolates analyzed.

RESULTS

Fifteen viruses from nasopharyngeal exudates and two from urine were isolated and are available for further study (see Table S2 in the supplemental material). Strains were named by following the WHO nomenclature for RUBV (37). The sequences obtained from these isolates were identical to those of the original samples. Sixteen belonged to cluster one, and the remaining one (577 A) belonged to cluster 4 (see below).

Genotyping. The homology observed among all of the sequences from the outbreak and the reference strains ranged from 97.8 to 98.2% for 1j and from 89.5% (2a) to 96.8% (1b) for the other genotypes (see Table S3 in the supplemental material). All of the sequences of the outbreak strains formed a well-supported cluster in the distance tree (Fig. 2) and grouped with the 1j reference strains with a significant bootstrap value of 88. These results together allow the strain causing the outbreak to be assigned to genotype 1j.

Sequence analysis. Four clusters and three sequences that did not fall within any group were identified within the outbreak (Fig. 2). Identical groups were obtained by the minimum-evolution method and the unweighted-pair group

method using average linkages with the same Mega v. 4.0 program, as well as by Bayesian inference with the Mr. Bayes program (data not shown). Patients in cluster 4 (577A, 581E) lived in the same area, first exhibited symptoms in the same week, and had the same maternal family name (although we have no direct evidence that they were related). No other significant correlations with epidemiological characteristics were found in other clusters.

The sequences in this study showed 28 variable positions with respect to vaccine strain RA27/3, 5 of them nonsynonymous. Three of these variations were present in all of the sequences, i.e., Y211H, V378L, and L339S, the last one located in a region that could be involved in the induction of proliferative responses of T-cell lines (29). Sequence 277E was present in 30 (75.0%) of the 40 sequences analyzed (Table 1; Fig. 2) that formed cluster 1. This strain seems to be the originally imported one since it was present in the first detected case, and no other sequence was found until week 8 (Table 1). Interestingly, the two sequences from the CRS cases also contained this strain. Cluster 2 (sequences 856E and 1247E) had one additional variable nucleotide at position 178, the third base of

TABLE 1. Differences in the nucleotide and predicted amino acid sequences of the four clusters and the individual sequence differences found compared with the reference sequence RVs/Miami.FL.USA/32.02[1j] in the 739-nt window from the E1 gene as recommended by the WHO

Cluster	Sequence	GenBank accession no.	Wk/yr	Nucleotide change (amino acid change[s]) in 739 nt from E1 gene with respect to:	
				RA27/3 vaccine sequence L78917	1j prototype sequence EF602117
1	277E ^c	EU518607	40/2004–13/2005	28 (Y211H, ^a L339S, ^b V378L ^b)	13 (L339S ^b)
2	856E	EU518614	10/2005	29 (Y211H, L339S, V378L)	14 (L339S)
	1247E	EU518606	13/2005	29 (Y211H, L339S, V378L)	14 (L339S)
3	825E	EU518612	10/2005	29 (Y211H, L339S, V378L)	14 (L339S)
	837E	EU518613	10/2005	30 (Y211H, L339S, V378L, T394S ^a)	15 (L339S, T394S ^a)
	896E	EU518616	10/2005	29 (Y211H, L339S, V378L)	14 (L339S)
4	577A	EU518608	8/2005	29 (Y211H, L339S, V378L)	14 (L339S)
	581E	EU518609	8/2005	29 (Y211H, L339S, V378L)	14 (L339S)
None	701E	EU518610	9/2005	29 (Y211H, G253C, ^a L339S, V378L)	13 (G253C, ^a L339S)
	719E	EU518611	9/2005	31 (Y211H, L339S, V378L)	16 (L339S)
	888E	EU518615	10/2005	29 (Y211H, L339S, V378L)	14 (L339S)

^a Change is located in an immunoreactive region.
^b Change is not located in an immunoreactive region.
^c Present in 30 sequences.

the codon, and remained silent. Cluster 3 (sequences 825E, 837E, and 896E) had one additional variable nucleotide at position 328, which remained silent, and sequence 837E had one additional variable nucleotide at position 704 which affected the first base of the codon, causing a change in amino acid T394S. This amino acid maps within an immunoreactive region (11, 14, 25, 33). Cluster 4 (577A and 581E) contained one additional variable nucleotide at position 247, which remained silent. Finally, sequences 701E, 719E, and 888E had particular nucleotide variations, but only sequence 701E showed the G253C amino acid alteration. This amino acid is also located in an immunoreactive region (11, 14, 25, 33).
In summary, 18 (85.7%) of the 21 specific mutations occurred at codon position 3 and remained silent. Of the three nonsynonymous mutations, two occurred at position 2 and one occurred at position 1 of the codon, leading to changes in the amino acid sequence.

DISCUSSION

In this report, we present the first data on RUBV genotypes in Spain in the context of an outbreak that involved a mainly nonvaccinated population from Latin America, as well as Spanish males (2) born before the introduction of the measles-mumps-rubella vaccine in the early 1980s (2). As the index case is unknown, the geographical origin of the outbreak remains unknown. It is unlikely that the origin was Latin American because the only information about the circulation of RUBV at the time of the outbreak corresponded to genotype 1C (36). Data concerning genotype circulation in Europe during these years showed genotypes 1E, 1G, and 1D (36). Genotypes 1E and 1G circulated in Belarus in 2004 and 2005 (17), and genotype 1E circulated in Poland in 2007 (22). Furthermore, recent findings about RUBV circulation in 2007 in Africa corresponded to genotypes 1E in Morocco, 1G in Uganda and Cote d’Ivoire, and 2B in South Africa (7). All of the published

sequences of genotype 1j came from Japan and the Philippines (40), but we do not have any epidemiological evidence linking the outbreak with the Far East. Consequently, this is the first report, to our knowledge, of the detection and isolation of genotype 1j in Europe. Considerable additional effort in RUBV genotyping is needed worldwide to obtain enough data and available sequences to reach consistent conclusions about global RUBV circulation, as is the case for measles virus in Europe (21).
Our results indicate that only one genotype circulated during this outbreak, in contrast to the three (1E, 1G, and 1D) that were circulating in the city of Minsk during the outbreak in Belarus (17). This can be explained by the difference in the lengths of the vaccination programs in Minsk, where rubella vaccination was introduced in 1996 (17), and Madrid, where the universal program started in 1981 (1). The earlier introduction of the vaccine in Madrid could account for a smaller susceptible population, which would make the simultaneous establishment of three genotypes unlikely. Additional studies of RUBV genotype circulation in areas with low or no vaccine coverage are needed to clarify this matter.
The strain causing this outbreak showed a characteristic amino acid change (L339S) with respect to vaccine strain RA27/3 that could be involved in the induction of proliferative responses of T-cell lines (29); however, vaccine failure was not observed. The nucleotide sequence of this strain seemed to remain invariable in the region studied during the first 19 weeks of the outbreak. However, two additional mutations in amino acids in immunoreactive regions (6, 23, 24, 29, 35) of the E1 glycoprotein arose subsequently, although signs of positive selection events were not observed. The E1 glycoprotein has an important role in attachment to the cell and contains important neutralization epitopes (10). Further studies of the biological properties and especially of the degree of neutralization of these strains by vaccine-induced antibodies are required. The proportions of synon-

ymous and nonsynonymous mutations were similar to those reported by other authors (6, 16, 17, 19, 30), confirming that RUBV is very stable compared with some alphaviruses and other RNA viruses, such as poliovirus and human immunodeficiency virus (12, 13, 20, 34). Additional research into the short-term evolution of RUBV in the context of outbreaks seems necessary in the light of these results.

In conclusion, this is the first characterization of an RUBV genotype causing an outbreak in Spain that has involved the circulation of a single genotype (1j). However, it could not be linked to any other concomitant circulating strain in the world due to the paucity of available data on RUBV genotypes. Further studies like this are necessary to obtain a more accurate picture of the global distribution of RUBV genotypes. Such information would allow outbreaks to be managed better and enable the effectiveness of the elimination effort to be monitored, as has been done with measles virus.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Joseph P. Icenogle, Emily Abernathy, and Paul A. Rota (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) for providing the primer sequences and the protocol for amplifying RUBV from isolates and clinical samples with the minimal acceptable window recommended by the WHO. We thank the Genomic Unit of the Instituto de Salud Carlos III for carrying out all of the automated sequencing. We also thank Fernando de Ory, Instituto de Salud Carlos III, for his careful review of an earlier draft of our manuscript.

This work received financial support from the fellowship for Ph.D. study by the Republic of Panama and Acuerdo de Encomienda de Gestión entre la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo and the Instituto de Salud Carlos III (dossier DGVI-1429/05-3).

REFERENCES

- Amela, C., and I. Pachón. 2000. La Vigilancia Epidemiológica del sarampión en el contexto del "Plan de acción para eliminar el sarampión en España." *Bol. Epidemiol. Semanal* 8:169–172.
- Anonymous. 2005. Brote Comunitario de Rubéola en la Población Residente en la Comunidad de Madrid. *Bol. Epidemiol. Comunidad Madrid* 11:33–53.
- Anonymous. 1999. Calendario vacunal 1999. *Bol. Epidemiol. Comunidad Madrid* 4:50–59.
- Anonymous. 2002. III Encuesta de serovigilancia de la Comunidad de Madrid. *Bol. Epidemiol. Comunidad Madrid* 8:3–43.
- Anonymous. 1996. Nuevo calendario vacunal. *Bol. Epidemiol. Comunidad Madrid* 19:25–27.
- Bosma, T. J., J. M. Best, K. M. Corbett, J. E. Banatvala, and W. G. Starkey. 1996. Nucleotide sequence analysis of a major antigenic domain of the E1 glycoprotein of 22 rubella virus isolates. *J. Gen. Virol.* 77:2523–2530.
- Caidi, H., E. S. Abernathy, A. Benjouad, S. Smit, J. Bwogi, M. Nanyunja, R. El Aouad, and J. Icenogle. 2008. Phylogenetic analysis of rubella viruses found in Morocco, Uganda, Cote d'Ivoire and South Africa from 2001 to 2007. *J. Clin. Virol.* 42:86–90.
- Casas, I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 53:25–36.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Global Measles and Rubella Laboratory Network, January 2004–June 2005. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54:1100–1104.
- Chantler, J., J. S. Wolinsky, and A. Tingle. 2001. Rubella virus, p. 963–990. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
- Chaye, H., P. Chong, B. Triplet, B. Brush, and S. Gillam. 1992. Localization of the virus neutralizing and hemagglutinin epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *Virology* 189:483–492.
- Coffin, J. M. 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176:143–164.
- Fitch, W. M. 1996. The variety of human virus evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5:247–258.
- Giessauf, A., T. Letschka, G. Walder, M. P. Dierich, and R. Wurznier. 2004. A synthetic peptide ELISA for the screening of rubella virus neutralizing antibodies in order to ascertain immunity. *J. Immunol. Methods* 287:1–11.
- Hinman, A. R., B. S. Hersh, and C. A. de Quadros. 1998. Rational use of rubella vaccine for prevention of congenital rubella syndrome in the Americas. *Rev. Panam. Salud Publica* 4:156–160.
- Hofmann, J., M. Renz, S. Meyer, A. von Haeseler, and U. G. Liebert. 2003. Phylogenetic analysis of rubella virus including new genotype 1 isolates. *Virus Res.* 96:123–128.
- Hübschen, J. M., M. Yermalovich, G. Semeiko, E. Samoilovich, E. Blatun, S. De Landtsheer, and C. P. Muller. 2007. Co-circulation of multiple rubella virus strains in Belarus forming novel genetic groups within clade 1. *J. Gen. Virol.* 88:1960–1966.
- Jin, L., and B. Thomas. 2007. Application of molecular and serological assays to case based investigations of rubella and congenital rubella syndrome. *J. Med. Virol.* 79:1017–1024.
- Katow, S., H. Minahara, M. Fukushima, and Y. Yamaguchi. 1997. Molecular epidemiology of rubella by nucleotide sequences of the rubella virus E1 gene in three East Asian countries. *J. Infect. Dis.* 176:602–616.
- Kinnunen, L., T. Poyry, and T. Hovi. 1992. Genetic diversity and rapid evolution of poliovirus in human hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176:49–61.
- Kremer, J. R., K. E. Brown, L. Jin, S. Santibanez, S. V. Shulga, Y. Aboudy, I. V. Demchishyna, S. Djemileva, J. E. Echevarria, D. F. Featherstone, M. Hukic, K. Johansen, B. Litwinska, E. Lopareva, E. Lupulescu, A. Mentis, Z. Mihneva, M. M. Mosquera, M. Muscat, M. A. Naumova, J. Nedeljkovic, L. S. Nekrasova, F. Magurano, C. Fortuna, H. R. de Andrade, J. L. Richard, A. Robo, P. A. Rota, E. O. Samoilovich, I. Sarv, G. V. Semeiko, N. Shugayev, E. S. Utegenova, R. van Binnendijk, L. Vinner, D. Waku-Kouomou, T. F. Wild, D. W. Brown, A. Mankertz, C. P. Muller, and M. N. Mulders. 2008. High genetic diversity of measles virus, World Health Organization European region, 2005–2006. *Emerg. Infect. Dis.* 14:107–114.
- Makowka, A., W. Gut, B. Litwinska, S. Santibanez, and A. Mankertz. 2007. Genotyping of measles and rubella virus strains circulating in Poland in 2007. *Euro. Surveill.* 12:E071025 2. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3295>.
- Mitchell, L. A., D. Decarie, A. J. Tingle, M. Zrein, and M. Lacroix. 1993. Identification of immunoreactive regions of rubella virus E1 and E2 envelope proteins by using synthetic peptides. *Virus Res.* 29:33–57.
- Mitchell, L. A., A. J. Tingle, D. Decarie, and R. Shukin. 1999. Identification of rubella virus T-cell epitopes recognized in anamnestic response to RA27/3 vaccine: associations with boost in neutralizing antibody titer. *Vaccine* 17:2356–2365.
- Mitchell, L. A., T. Zhang, M. Ho, D. Decarie, A. J. Tingle, M. Zrein, and M. Lacroix. 1992. Characterization of rubella virus-specific antibody responses by using a new synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 30:1841–1847.
- Mosquera Mdel, M., F. de Ory, M. Moreno, and J. E. Echevarria. 2002. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:111–116.
- Mosquera Mdel, M., J. C. Sanz, J. E. Echevarria, N. Herranz, M. Fernandez, and F. de Ory. 2006. Diagnostic performance of specific IgM detection and genomic amplification in rubella. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24:251–253.
- Mosquera, M. M., F. Ory, and J. E. Echevarria. 2005. Measles virus genotype circulation in Spain after implementation of the national measles elimination plan 2001–2003. *J. Med. Virol.* 75:137–146.
- Ou, D., P. Chong, A. J. Tingle, and S. Gillam. 1993. Mapping T-cell epitopes of rubella virus structural proteins E1, E2, and C recognized by T-cell lines and clones derived from infected and immunized populations. *J. Med. Virol.* 40:175–183.
- Saitoh, M., N. Shinkawa, S. Shimada, Y. Segawa, K. Sadamasu, M. Hasegawa, M. Kato, K. Kozawa, T. Kuramoto, O. Nishio, and H. Kimura. 2006. Phylogenetic analysis of envelope glycoprotein (E1) gene of rubella viruses prevalent in Japan in 2004. *Microbiol. Immunol.* 50:179–185.
- Sanz, J. C., C. Lemos, D. Herrera, and R. Ramirez-Fernandez. 2004. Brote de rubéola en población inmigrante de origen latinoamericano. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22:197.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
- Terry, G. M., L. Ho-Terry, P. Londesborough, and K. R. Rees. 1988. Localization of the rubella E1 epitopes. *Arch. Virol.* 98:189–197.
- Wain-Hobson, S. 1993. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:878–883.
- Wolinsky, J. S., M. McCarthy, O. Allen-Cannady, W. T. Moore, R. Jin, S. N. Cao, A. Lovett, and D. Simmons. 1991. Monoclonal antibody-defined epitope map of expressed rubella virus protein domains. *J. Virol.* 65:3986–3994.
- World Health Organization. 2006. Global distribution of measles and rubella genotypes—update. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 81:474–479.
- World Health Organization. 2005. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 80:126–132.
- World Health Organization. 25 September 2007, accession date. Strategic plan for measles and congenital rubella infection in the European region of

- WHO. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark. [Online.] <http://www.euro.who.int/document/e81567.pdf>.
39. **World Health Organization**. 25 September 2007, accession date. Surveillance guidelines for measles and congenital rubella infections in the WHO European region. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark. [Online.] <http://www.euro.who.int/document/e82183.pdf>.
40. **World Health Organization**. 2007. Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses, 2007. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **82**:216–222.
41. **Zheng, D. P., T. K. Frey, J. Icenogle, S. Katow, E. S. Abernathy, K. J. Song, W. B. Xu, V. Yarulin, R. G. Desjatskova, Y. Aboudy, G. Enders, and M. Croxson**. 2003. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:1523–1530.